

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR CHIRURGIE
DIREKTOR: PROF. DR. MED. HANS JÜRGEN SCHLITT
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**BEDEUTUNG DER KINASE B-RAF UND DES VEGF-REZEPTOR-2
FÜR DIE MOLEKULARE THERAPIE VON
HEPATOZELLULÄREN KARZINOMEN**

Inaugural - DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Isabel Valeska Brecht
aus Stuttgart

2010

Dekan: Prof. Dr. med. Bernhard Weber, Universität Regensburg

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Oliver Stöltzing, Klinik und Poliklinik für
Hepatobiliäre Chirurgie und Transplantationschirurgie,
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Reinhard Andreesen, Hämatologie, Universität Regensburg

Tag der mündlichen Prüfung: 14. Oktober 2010

Inhaltsverzeichnis

1. Abkürzungen	1
2. Zusammenfassung	2
3. Einleitung	4
3.1. Das hepatozelluläre Karzinom	4
3.1.1. Epidemiologie	4
3.1.2. Risikofaktoren	4
3.1.3. Therapie	5
3.1.3.1. Chirurgische Therapie	5
3.1.3.2. Perkutane Verfahren	5
3.1.3.3. Transarterielle Therapieoptionen	5
3.1.3.4. Systemische Chemotherapie	6
3.1.4. Prognose	6
3.2. Hepatokarzinogenese	6
3.3. Der Ras-Raf-MEK-ERK-Signaltransduktionsweg	8
3.3.1. Allgemeine Funktionsweise	8
3.3.2. Bedeutung der Ras-Raf-MEK-ERK-Kaskade in der Karzinogenese	9
3.3.3. Die Ras-Raf-MEK-ERK-Kaskade als therapeutischer Angriffspunkt	10
3.4. Angiogenese	11
3.4.1. Angiogenese im hepatozellulären Karzinom	11
3.4.2. Angiogenese als therapeutischer Angriffspunkt	12
3.5. Kombinierte Inhibition von B-Raf und VEGF-Rezeptor2 als antiproliferative und antiangiogenetische Strategie zur Behandlung des hepatozellulären Karzinoms	12
4. Material und Methoden	14
4.1. Geräte	14
4.2. Materialien	14
4.3. Chemikalien	14
4.4. Antikörper und Wachstumsfaktoren	15
4.5. Medien, Medienzusätze und andere Zellkulturreagenzien	16

4.6. Zellkultur und NVP-AAL881	17
4.7. Western Blot	17
4.8. MTT	18
4.9. Migration	18
4.10. Tierversuch	19
4.11. Immunhistochemische Untersuchungen	19
4.11.1. CD-31 positive Gefäßfläche	19
4.11.2. Tumorzellproliferation-Nachweis mittels BrdU	20
4.12. Statistik	21
 5. Ergebnisse	 22
5.1. Auswirkungen des NVP-AAL881 auf Tumorzellen <i>in vitro</i>	22
5.1.1. Effekt des NVP-AAL881 auf die Proliferation der HCC-Zellen	22
5.1.2. Einfluss des NVP-AAL881 auf die Aktivierung von Signalwegen	23
5.1.3. Effekt des NVP-AAL881 auf die Migrationsfähigkeit der Tumorzellen	25
5.2. Auswirkungen des NVP-AAL881 auf Endothelzellen und Gefäßmuskelzellen <i>in vitro</i>	27
5.2.1. Effekt des NVP-AAL881 auf die Proliferation der Endothelzellen und VSMCs	27
5.2.2. Einfluss des NVP-AAL881 auf die Migrationsfähigkeit der Endothel- und Gefäßmuskelzellen	29
5.2.3. Effekt des NVP-AAL881 auf die Signalfähigkeit der Endothelzellen	30
5.3. Auswirkungen des NVP-AAL881 auf Tumorzellen <i>in vivo</i>	31
5.3.1. Effekt des NVP-AAL881 auf das Wachstum des HCCs <i>in vivo</i>	31
5.3.2. Einfluss des NVP-AAL881 auf die Angiogenese <i>in vivo</i>	33
5.3.3. Effekt des NVP-AAL881 auf die Proliferation <i>in vivo</i>	34
 6. Diskussion	 35
6.1. Inhibition der HCC-Proliferation	35
6.2. Einfluss auf STAT3 und Migration	36
6.3. Auswirkung auf die Angiogenese	37
6.4. Wertung und Ausblick	38
 7. Literaturverzeichnis	 39

8. Lebenslauf	45
9. Danksagung	46
10. Erklärung	47

1. Abkürzungen

DAB	Diaminobenzidin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
EGF	<i>engl.</i> : epidermal growth factor (epidermaler Wachstumsfaktor)
ERK	<i>engl.</i> : extracellular-signal-regulated kinase
FCS	<i>engl.</i> : fetal calf serum (fötales Kälberserum)
Grb2	<i>engl.</i> : growth-factor-receptor-bound protein 2
GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
HBV	Hepatitis B-Virus
HBx	Hepatitis B X-Protein
HCC	<i>engl.</i> : hepatocellular carcinoma (hepatozelluläres Karzinom)
HCV	Hepatitis C-Virus
HGF	<i>engl.</i> : hepatocyte growth factor (Hepatozyten Wachstumsfaktor)
HIF	<i>engl.</i> : hypoxia-inducible factor (Hypoxie-induzierter Faktor)
HPF	<i>engl.</i> : high power field
HRP	Meerrettich-Peroxidase
MEK	MAPK/extracellular-signal-regulated kinase
MAPK	mitogen-aktivierte Protein-Kinase
MTT	Methylthiazoltetrazolium
PECAM	<i>engl.</i> : platelet endothelial cell adhesion molecule
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PDGF	<i>engl.</i> : platelet-derived growth factor
RTK	Rezeptortyrosinkinase
SDS-PAGE	<i>engl.</i> : <u>s</u> odium <u>d</u> odecyl <u>s</u> ulfate <u>p</u> oly <u>a</u> crylamide <u>g</u> el <u>e</u> lectrophoresis (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese)
SOS	<i>engl.</i> : son of sevenless
STAT3	<i>engl.</i> : signal transducer and activator of transcription 3
TACE	transarterielle Chemoembolisation
TGF	<i>engl.</i> : transforming growth factor
VEGF	<i>engl.</i> : vascular epidermal growth factor
VSMC	<i>engl.</i> : vascular smooth muscle cell (Gefäßmuskelzelle)

2. Zusammenfassung

Das hepatozelluläre Karzinom (HCC) ist eine aggressive und insgesamt sehr therapierefraktäre Tumorentität mit schlechter Prognose und hohen Rezidivraten. In der Entstehung des HCCs spielt die Aktivierung der Ras-Raf-MEK-ERK-Signalkaskade, ein onkogener Signaltransduktionsweg, der aus mehreren mitogen-aktivierten Protein-Kinasen besteht, eine zentrale Rolle. Besonders die Raf-Kinase besitzt eine Schlüsselfunktion in der Aktivierung des Signalweges. Zudem wird die Angiogenese und Vaskularisierung des HCC, ein Prozess der für das Tumorwachstum essentiell ist, ganz wesentlich über den Wachstumsfaktor VEGF vorangetrieben. Wir postulierten daher, dass eine kombinierte therapeutische Inhibition der B-Raf-Kinase sowie des VEGF-Rezeptors-2 das Tumorwachstum und die Angiogenese des HCCs vermindern könnte. In der vorliegenden Studie wurde diese Hypothese anhand von *in vitro* Experimenten sowie von experimentellen Tumormodellen *in vivo* überprüft.

Für die Versuche wurden humane HCC-Zelllinien, Endothelzellen (HUVEC) und Gefäßmuskelzellen (VSMC) verwendet. Um die Wirkung der Raf-Kinase und des VEGF-Rezeptors therapeutisch zu inhibieren, wurde ein kleinmolekularer Inhibitor, NVP-AAL881, verwendet. Der Aktivierungszustand der Signalwege wurde anhand von Western Blotting und die Veränderungen der Zellmotilität mithilfe von Migrationsexperimenten untersucht. Zum Nachweis der Auswirkung auf die Zellproliferation verwendeten wir MTT-Tests. Abschließend untersuchten wir die Auswirkungen der molekularen Therapie mit NVP-AAL881 auf das Tumorwachstum in einem subkutanen Tumormodell *in vivo*.

Die Ergebnisse zeigten, dass eine Behandlung mit NVP-AAL881 zu einer verminderten Aktivierung von ERK und STAT3 in HCC-Zellen sowie zu einer verminderten Tumorzellproliferation *in vitro* führt. Außerdem kam es unter dieser Therapie nicht nur zu einer signifikanten Reduktion der Migration von Karzinomzellen, sondern auch von Endothel- und Gefäßmuskelzellen, zwei wesentlichen Komponenten der Tumorangiogenese. In Endothelzellen konnte durch NVP-AAL881 zusätzlich eine durch konditioniertes Medium induzierte STAT3-Aktivierung blockiert werden. *In vivo* reduzierte NVP-AAL881 signifikant das Tumorwachstum, die CD31-positive Gefäßfläche und die Anzahl der BrdU-positiven proliferierenden Karzinomzellen.

Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass eine kombinierte Inhibition von B-Raf und VEGF-Rezeptor-2 wesentliche onkogene Signalwege in HCC hemmt und somit effizient das Tumorwachstum und die Vaskularisation reduziert. Insgesamt könnte diese molekulare

Strategie eine valide Option zur Behandlung von Patienten mit einem hepatozellulären Karzinom darstellen.

3. Einleitung

3.1. Das hepatozelluläre Karzinom

3.1.1. Epidemiologie

Das hepatozelluläre Karzinom (HCC) zählt zu den häufigsten malignen Tumoren mit über 550.000 neuen Fällen pro Jahr. Damit steht es weltweit an fünfter Stelle der Inzidenzen und an dritter Stelle der krebsassoziierten Todesfälle {Parkin DM, 2001}. Es zeigen sich allerdings ausgeprägte geografische Unterschiede. In Europa und Nordamerika ist die Inzidenz vergleichsweise niedrig, während 80% der neu aufgetretenen Fälle in Entwicklungsländern in Asien und Afrika gezählt werden {Thomas MB, 2005}. Dies ist insbesondere auf die hohe Durchseuchungsrate mit Hepatitis B in diesen Ländern zurückzuführen. Allein in China werden 55% der weltweiten HCC-Fälle gezählt {Parkin DM, 2005}. Allerdings hat die Inzidenz auch in Europa und den USA in den letzten Jahren stark zugenommen, was vor allem in der Zunahme der Hepatitis C-Virus(HCV)-Infektionen in diesen Regionen begründet liegt {El Serag HB, 1999; Bosch FX, 2004}. Ein weiterer geografischer Unterschied wird beim Altersgipfel auffällig: er liegt in Europa und USA bei 50-60 Jahren, in Afrika und Asien dagegen ein bis zwei Jahrzehnte früher. Auch in der Geschlechterverteilung gibt es Unterschiede: Männer sind zwei bis vier Mal häufiger als Frauen betroffen {Bosch FX, 2004}.

3.1.2. Risikofaktoren

Bei über 80% der Patienten entwickelt sich das hepatozelluläre Karzinom auf dem Boden einer Leberzirrhose, weshalb diese als Präkanzerose anzusehen ist {Thomas MB, 2005}. Eine Leberzirrhose wird hauptsächlich durch Hepatitis B-Virus- oder Hepatitis C-Virus-Infektionen hervorgerufen {Trinchet JC, 2007}. Mehr als 75% der weltweiten, und 85% der HCC-Fälle in Entwicklungsländern werden durch diese zwei Viren verursacht {Parkin DM, 2006}. In westlichen Ländern zählt neben der HCV-Infektion auch die Alkohol-induzierte Leberzirrhose zu den häufigsten HCC-Ursachen {Thomas MB, 2005}. Doch auch hereditäre Erkrankungen wie die Hämochromatose, ein α -Antitrypsin-Mangel oder Morbus Wilson und außerdem chemische Karzinogene (Aflatoxin B1 u.a.) können zu einem HCC führen {Bosch FX, 2004}.

3.1.3. Therapie

Die Art der Therapie ist abhängig vom Tumorstadium und der Einschränkung der Leberfunktion. Grundsätzlich kann die Behandlung des HCCs in chirurgische, perkutane und transarterielle Verfahren eingeteilt werden.

3.1.3.1. Chirurgische Therapie

In der Chirurgie ist es möglich, eine Resektion der HCC-Leberräumforderung oder eine Lebertransplantation durchzuführen. Die Leberresektion ist die Therapie der Wahl bei Patienten mit einem solitären HCC ohne Gefäßbeteiligung oder extrahepatischer Manifestation und gut erhaltener Leberfunktion. Dazu gehört ein normaler Bilirubinwert und das Fehlen einer portalen Hypertension. Werden diese Selektionskriterien eingehalten, beträgt die 5-Jahresüberlebensrate bis zu 70% {Llovet JM, 2003}.

Die Lebertransplantation ist theoretisch die optimale und radikalste onkologische Option, da hierdurch sowohl das Malignom als auch die zugrunde liegende Zirrhose behandelt werden kann. Indiziert ist eine Transplantation bei Patienten mit einem Tumor kleiner als 5 cm oder maximal drei Tumorherden kleiner als 3 cm (sog. Milan-Kriterien). In diesen Fällen beträgt die 5-Jahresüberlebensrate mehr als 70%, mit einer Rezidivrate von weniger als 15%. Von zentraler Bedeutung ist es, die Wartezeit auf ein Transplantat möglichst unter sechs Monaten zu halten, da ansonsten der Tumor während der Warteperiode zu groß zu werden droht. Dies wird jedoch erschwert durch die begrenzte Anzahl an Lebertransplantaten {Llovet JM, 2003}.

3.1.3.2. Perkutane Verfahren

Eine perkutane Therapie ist bei kleinen, nicht-resezierbaren Karzinomen eine gute Behandlungsoption. Bei der perkutanen Äthanolinjektion kommt es durch die Injektion des Alkohols zur Nekrose und Fibrose der Tumorzellen. In hepatozellulären Karzinomen, die kleiner als 2 cm sind, führt diese Methode in 90-100%, in HCCs mit 5 cm Durchmesser in 50% zum Erfolg. Die 5-Jahresüberlebensrate beträgt 50%. Ähnliche Erfolge werden mit der Radiofrequenzablation erzielt {Llovet JM, 2003}.

3.1.3.3. Transarterielle Therapieoptionen

Die transarterielle Chemoembolisation (TACE) wird bei Patienten mit inoperablen, multifokalen Tumoren angewandt und führt in den stark vaskularisierten Tumoren zu Nekrosen. Dabei wird ein Ansprechen in 15-55% der Patienten erzielt und sowohl der

Tumorprogress als auch die Gefäßinvasion verzögert. Die TACE wird außerdem als postoperative adjuvante und palliative Behandlung eingesetzt {Llovet JM, 2003}.

3.1.3.4. Systemische Chemotherapie

Bislang wurde in keiner randomisierten Studie ein Effekt einer systemischen Chemotherapie auf das Überleben festgestellt {Thomas MB, 2005; Lai EC, 1998}. Daraus lässt sich schließen, dass das HCC ein chemoresistentes Karzinom ist, welches nicht sehr gut auf eine Chemotherapie anspricht. Dies liegt vermutlich an der hohen Expression von Genen, die für eine Medikamentenresistenz des hepatozellulären Karzinoms verantwortlich sind, so genannte „drug-resistance genes“ {Thomas MB, 2005}. Eine neuere Therapieform stellt die molekulare Therapie dar. Aktuell konnte mittels eines Inhibitors gegen multiple Tyrosinkinasen (VEGFR, PDGFR, Kit), Sorafinib (Nexavar), ein erster Behandlungserfolg verzeichnet werden. Allerdings kann auch mittels dieser innovativen Therapie das mittlere Überleben lediglich um zwei Monate verlängert werden, so dass weiterhin intensiver Forschungsbedarf besteht.

3.1.4. Prognose

Die Prognose ist ebenso wie die Therapie von Tumorstadium und Funktionszustand der Leber abhängig {Bruix J, 1997}. Obwohl eine große Bandbreite an Therapiemöglichkeiten besteht, bleibt die Prognose des HCCs aber weiterhin schlecht. Die Tumorprogressions- und Rezidivraten sind relativ hoch. Hinzu kommt, dass die Mehrheit der Patienten (70-85%), trotz der Früherkennungsmöglichkeiten durch Bestimmung des α -Fetoproteins und einer Ultraschalluntersuchung, erst mit fortgeschrittener Krankheit diagnostiziert wird, wenn eine Resektion oder Transplantation keinen kurativen Effekt mehr verspricht {Thomas MB, 2005}. Trotz der großen Anzahl an Therapiemöglichkeiten ist es bis heute nicht gelungen, eine optimale Therapie der ersten Wahl zu finden {Llovet JM, 2003}. Erschwert wird dies durch die Heterogenität der Krankheit in Anbetracht der Ätiologie, der klinischen Präsentation und der oftmals zugrunde liegenden Leberschäden {Thomas MB, 2005}. Doch aufgrund der Aggressivität der Krankheit und der fortschreitenden Inzidenz ist es dringend notwendig, weiterhin an neuen Therapiealternativen zu forschen.

3.2. Hepatokarzinogenese

Auf molekularer Ebene sind bis heute viele verschiedene Wege bekannt, die zum hepatozellulären Karzinom führen können. Dabei rufen meist externe Stimuli genetische

Veränderungen in den Hepatozyten hervor. Diese Veränderungen führen zu vermehrter Zellproliferation. Aufgrund der unterschiedlichen Ätiologie des HCC wurden bisher jedoch keine einheitlichen genetischen Veränderungen gefunden, die in allen hepatozellulären Karzinomen vorhanden sind {Pang R, 2007}. Je nach schädigendem Einfluss auf die Leber, sei es ein Virus oder Alkohol, kommt es zu unterschiedlichen molekularen Mechanismen, die letztendlich in der Karzinogenese resultieren. Am Beispiel des Hepatitis B-Virus (HBV) sollen einige dieser molekularen Vorgänge im Folgenden verdeutlicht werden. Insgesamt sind drei verschiedene Mechanismen des HBV, die zur Hepatokarzinogenese führen, bekannt. Zum einen kann das Virus seine DNA in das Leberzellgenom einbauen, zum anderen ist es befähigt Mutationen hervorzurufen und ferner kann es die Zellproliferation direkt beeinflussen, indem es virale Proteine expremiert, insbesondere das X Protein (HBx). HBx ist an der Koordination des Gleichgewichtes zwischen Zellproliferation und Apoptose beteiligt. Als Transaktivator sorgt es für vermehrte Expression von Protoonkogenen wie c-myc und Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B und AP-2 {Pang R, 2007}. Ist HBx im Zytoplasma lokalisiert, kann es außerdem mehrere Signaltransduktionswege stimulieren. Studien haben ergeben, dass HBx den Ras-Raf-MEK-ERK-Signalweg {Benn J, 1994}, den JAK/STAT-Signalweg {Lee YH, 1998}, den Wnt/ β -catenin-{Cha MY, 2004} und den p21waf1/cip1-Weg {Park US, 2000} aktivieren kann. Des Weiteren ist es HBx möglich, mit dem Tumorsuppressorgen p53 in Verbindung zu treten. Auf diese Weise kann es p53-abhängige Vorgänge inhibieren, unter anderem die durch p53 ausgelöste Apoptose. Und auch die Angiogenese wird durch HBx direkt beeinflusst, indem der Angiogenesefaktor VEGF hochreguliert wird. Es existieren also viele Möglichkeiten, durch die allein das Hepatitis B-Virus zum HCC führen kann. Zusätzlich zu den direkten karzinogenen Effekten der viralen Onkogene können auch genetische und epigenetische Veränderungen zur Hepatokarzinogenese beitragen. So kommt es zum Beispiel durch wiederholte Beschädigung und Regeneration der Hepatozyten während chronischer Hepatitis oder Leberzirrhose zu solchen genetischen Variationen, die vor allem in einer Aktivierung positiver Mediatoren der Zellproliferation und Inaktivierung hemmender Faktoren der Zellproliferation resultieren {Pang R, 2007}.

3.3. Der Ras-Raf-MEK-ERK-Signaltransduktionsweg

3.3.1. Allgemeine Funktionsweise

Mit Hilfe von Signaltransduktionswegen können extrazelluläre Signale bestimmte Reaktionen in der Zelle hervorrufen. Über die Ras-Raf-MEK-ERK-Kaskade werden dabei vor allem Zellproliferation, Zelldifferenzierung und das Überleben der Zelle gesteuert. Die Kaskade besteht aus mehreren intrazellulären Protein-(Serin-/Threonin)Kinasen, die auch mitogen-aktivierte Protein-Kinasen (MAPK) genannt werden und sich durch gegenseitige Phosphorylierung aktivieren. Zu Beginn des Signaltransduktionsweges muss ein extrazelluläres Signal in Form von Wachstumsfaktoren wie EGF, VEGF oder PDGF oder Hormonen vorhanden sein {Sridhar S, 2005}. Dieses Signalmolekül bindet an der Zelloberfläche an eine Rezeptor-Tyrosinkinase (RTK), die mit dem Grb2-Protein, welches als Adapter fungiert, verbunden ist (vgl. Abb. 1). Nach Bindung des Signals veranlasst Grb2 die Aktivierung eines GTP/GDP-Austausch-Faktors, des so genannten SOS. Dadurch wird das G-Protein Ras aktiviert, welches in seiner inaktiven Form an GDP gebunden ist, nun aber durch das SOS in die aktive GTP-gebundene Form übergeht {Hilger RA, 2002}. Ras ist nun in der Lage, die MAPK Kinase Kinase (MAPKKK) Raf an die Zellmembran zu rekrutieren. Es sind drei verschiedene Raf-Isoformen bekannt: Raf-1 (C-Raf), A-Raf und B-Raf. Obwohl alle drei Raf-Formen mit Ras interagieren, gibt es wichtige Unterschiede. Nur B-Raf wird durch die alleinige Bindung an Ras aktiviert, für die Aktivierung von A-Raf und Raf-1 sind zusätzliche Signale erforderlich, die inhibitorische Phosphorylierungen aufheben können. Alle Raf-Isoformen haben die MAPK Kinase (MAPKK) MEK1/2 als gemeinsames weiteres Substrat nachgeschaltet, das durch Phosphorylierung aktiviert wird. MEK1/2 phosphoryliert und aktiviert daraufhin seinerseits ERK1 und ERK2, die auch p44- und p42-MAPK genannt werden. Aktiviertes ERK1 und ERK2 stehen am Ende der Signaltransduktionskaskade und haben mehr als 50 bisher identifizierte Substrate {Hilger RA, 2002}. Dazu gehören Wachstumsfaktorrezeptoren ebenso wie Transkriptionsfaktoren, Proteine des Zytoskeletts, Phospholipasen und andere Proteine, die im Zytosol oder im Nukleus lokalisiert sind. Um letztere zu aktivieren, kann ERK in den Nukleus translozieren und dort durch Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren die Genexpression kontrollieren. Auf diese Weise ist es je nach Stimulus und Zelltyp möglich, proliferative und mitogene Signale von extrazellulär in gezielte Zellantworten umzusetzen {Hilger RA, 2002}.

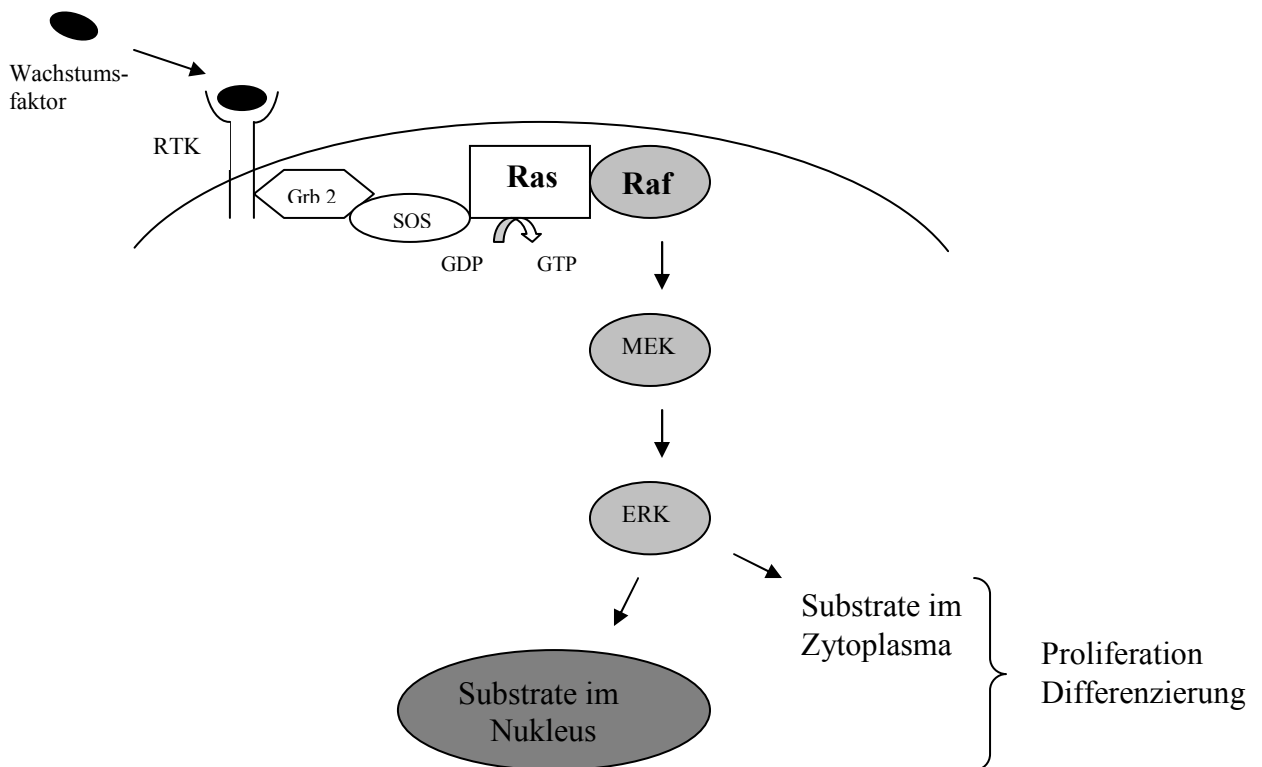


Abb.1: Schematische Darstellung der Ras-Raf-MEK-ERK-Signalkaskade

3.3.2. Bedeutung der Ras-Raf-MEK-ERK-Kaskade in der Karzinogenese

Die Karzinogenese beruht im allgemeinen vor allem auf folgenden Mechanismen: Zum Einen sind meist Onkogene in abnormal hoher Zahl exprimiert oder aufgrund von Mutationen aktiviert, zum Anderen sind Tumorsuppressorgene oftmals nur in geringem Ausmaß aktiviert oder exprimiert.

Neben anderen krebsbeeinflussenden Faktoren ist inzwischen bekannt, dass der Ras-Raf-MEK-ERK-Signaltransduktionsweg eine große Bedeutung bei der Karzinogenese vieler Tumorarten spielt. Sowohl das Ras-Protein als auch die B-Raf-Kinase sind Protoonkogene, die durch Mutation zur Karzinomentwicklung beitragen können. Eine solche Mutation kann im Falle eines HCCs zum Beispiel durch Hepatitis-Viren hervorgerufen werden (siehe 3.2.). In 15-30% aller Krebsfälle liegen aktivierende Mutationen von Ras vor und Daten von 2002 {Davies H, 2002} belegen, dass B-Raf in ungefähr 7% der Karzinome mutiert ist. Durch diese Mutation wird die Raf-Kinase aktiviert, ohne ein stimulierendes Signal des übergeordneten Ras erhalten zu haben. Somit kann ERK stimuliert werden und dadurch die Proliferation und Transformation zu Tumorzellen induziert werden. Insgesamt ist die Ras-Raf-MEK-ERK-

Kaskade in ca. 30% aller Karzinomfälle überaktiviert {Garnett M, 2004}. Dies ist jedoch nicht nur auf die Mutationen in Ras und Raf zurückzuführen, denn auch Rezeptortyrosinkinasen wie EGF-, PDGF- oder VEGF-Rezeptoren sind in vielen malignen Tumoren mutiert oder überexprimiert {Sridhar S, 2005}.

Auch in menschlichem HCC-Gewebe wurde die Expression und Aktivität der MAP-Kinasen untersucht. Dabei konnte man eine signifikante Zunahme der ERK1- und ERK2-Expression im Tumorgewebe nachweisen, im Vergleich zum angrenzenden nicht-neoplastischen Leberanteil. Daraus resultierend wurde auch eine Aktivitätssteigerung des ERK2 in eben diesem Tumorgewebe festgestellt. Außerdem entdeckte man zusätzlich einen signifikanten Anstieg der MEK1- und MEK2-Expression im HCC-Gewebe {Schmidt C, 1997}. Eine andere Studie zeigte, dass auch eine Überexpression von Ras in hepatozellulären Karzinomen und präneoplastischen Läsionen vorhanden ist {Coleman WB, 2003}. Zusätzlich fand man heraus, dass der Verlust von Raf-Kinase-Inhibitorproteinen die HCC-Proliferation und -Migration fördert {Lee HC, 2006}. Alle diese Studienergebnisse lassen darauf schließen, dass der Ras-Raf-MEK-ERK-Signalweg eine bedeutende Rolle bei der Hepatokarzinogenese spielt {Pang R, 2007}. Aus diesem Grund stellen die Komponenten dieser Kaskade viel versprechende Ziele für neue Therapieansätze gegen das hepatozelluläre Karzinom dar.

3.3.3. Die Ras-Raf-MEK-ERK-Kaskade als therapeutischer Angriffspunkt

Verschiedene Strategien wurden entwickelt, um die Ras-Raf-MEK-ERK-Kaskade in ihrer Funktion zu hemmen. Therapeutische Bemühungen, die sich gegen Ras richteten, waren jedoch enttäuschend {Beeram M, 2005}. Die Raf-Kinase allerdings ist ein interessanter Angriffspunkt für neue Therapeutika, da sie als einziges Substrat die MEK Kinase besitzt und somit als Schlüsselaktivator gilt, während andere vorgeschaltete Komponenten wie Ras mehrere Effektorsubstrate besitzen. Um die Aktivität von Raf zu inhibieren, wurden so genannte Antisense Oligonucleotide, die die Raf-Expression hemmen, sowie kleinmolekulare Kinase-Inhibitoren und „dominant interfering“-DNA-Konstrukte entwickelt {Beeram, 2005}. Die meisten sind noch in der präklinischen oder klinischen Forschung. Momentan ist der erfolgreichste Raf-Kinase-Inhibitor das Sorafenib, welches im Jahre 2005 für die Behandlung von Nierenzellkarzinomen die Zulassung erlangte {Roberts PJ, 2007}. Es ist nachgewiesen, dass eine Behandlung mit Sorafenib das Überleben von Patienten mit Nierenzellkarzinomen signifikant verlängert, verglichen mit einer Placebo-Behandlungsgruppe {Escudier B, 2005}. Inzwischen werden Studien mit Sorafenib zusätzlich in anderen Karzinomen durchgeführt. Auch im HCC wurde die Wirkung dieses Raf-Kinase-Inhibitors untersucht. Dabei fand man

heraus, dass Sorafenib die Proliferation der HCC-Zelllinien hemmt, Tumorangiogenese inhibiert und Apoptose in den Tumorzellen induziert {Liu L, 2006}. Aufgrund dieser Daten stellt die Blockade der Ras-Raf-MEK-ERK-Kaskade eine verheißungsvolle Strategie in der Therapie des hepatozellulären Karzinoms dar.

3.4. Angiogenese

3.4.1. Angiogenese im hepatozellulären Karzinom

Das hepatozelluläre Karzinom ist ein stark vaskularisierter Tumor, der während seines Wachstums ständig neue Blutgefäße bildet. Diese Entstehung neuer Gefäße ist für das Tumorstadium essentiell, da auf diesem Weg die Zufuhr an Nährstoffen und Sauerstoff gesichert wird {Semela D, 2004}. Die Angiogenese ist ein komplexer dynamischer Vorgang, der von mehreren pro- und antiangiogenetischen Faktoren bestimmt wird {Hicklin D, 2005}. Besteht eine Hypoxie im Tumorgewebe oder liegen genetische Veränderungen in Tumorsuppressorgenen oder Onkogenen vor, so werden angiogenetische Faktoren von den HCC-Zellen sezerniert. Dazu gehören VEGF, PDGF, TGF- β und andere. VEGF ist jedoch der wichtigste und stärkste stimulatorische Faktor dieser Gruppe. In den meisten Karzinomarten ist er hochreguliert und auch im HCC wird mehr VEGF gebildet als im umliegenden nicht-tumorösen Gewebe. Es ist nachgewiesen, dass mit einer Überexpression von VEGF eine erhöhte Neovaskularisation, vermehrtes Tumorstadium und eine schlechtere Prognose einhergehen. Außerdem korreliert das Ausmaß der VEGF-Expression mit dem Tumorstadium, es steigt von leichtgradiger Dysplasie bis zum HCC stetig an {Semela D, 2004}. Sezerniertes VEGF aktiviert Endothelzellen hauptsächlich über den VEGF-Rezeptor 2 (VEGFR2), der auf fast allen Endothelzellen exprimiert ist {Ferrara N, 2003}, und bei Aktivierung unter anderem eine MEK/ERK-getriggerte Reaktion hervorrufen kann {Roux PP, 2004}. Durch diese Stimulation werden das Überleben der Endothelzellen, das Wachstum, die Differenzierung und Migration gefördert. So sind die Endothelzellen in der Lage, neue Gefäßformationen zu bilden {Roy H, 2006}. Zusätzlich werden durch VEGF und PDGF-B die glatten Gefäßmuskelzellen stimuliert, die zur Stabilisierung der neuen Gefäße benötigt werden {Roy H, 2006; Semela D, 2004}. Neben VEGF spielen jedoch auch andere Faktoren eine Rolle in der Angiogenese des hepatozellulären Karzinoms, wie zum Beispiel der Transkriptionsfaktor STAT3. Wie kürzlich in einer Studie herausgefunden wurde, korreliert die Expression des phosphorylierten und somit aktivierten STAT3 signifikant mit der Gefäßdichte des HCCs {Yang SF, 2007}. Nicht nur im hepatozellulären, sondern auch in

anderen Karzinomen wie dem multiplen Myelom, Prostata- oder Pankreaskarzinom ist der Transkriptionsfaktor ständig aktiviert {Li WC, 2006}. Dies weist auf eine hohe Bedeutung des STAT3 in der Onkogenese hin. Außerdem steht die Expression des phosphorylierten STAT3 in Zusammenhang mit einem verkürzten Überleben der HCC-Patienten und kann darum als prädiktiver Faktor nützlich sein {Yang SF, 2007}.

3.4.2. Angiogenese als therapeutischer Angriffspunkt

Da das Tumorwachstum angiogenese-abhängig ist, eröffnen sich weitere Möglichkeiten zur anti-neoplastischen Therapie. Diese beruhen auf dem Gedanken, dass durch eine Blockade der Angiogenese das Tumorwachstum gebremst werden müsste. Als Angriffsziel steht wegen seiner Schlüsselfunktion in der Angiogenese vor allem der VEGF-Signalweg im Fokus des Interesses. Verschiedene Anti-VEGF-Strategien wurden entwickelt, darunter Antikörper gegen VEGF oder VEGF-Rezeptoren und Tyrosinkinaseinhibitoren der VEGF-Rezeptoren {Hicklin D, 2005}. Schon im Jahre 1993 wurde die Unterdrückung des Tumorwachstums durch einen VEGF-Antikörper bewiesen {Kim KJ, 1993}. Inzwischen haben viele Studien gezeigt, dass die Hemmung der Angiogenese eine viel versprechende Strategie in der Behandlung vieler Karzinomarten, darunter auch des hepatozellulären Karzinoms, darstellt {Semela D, 2004}. Einige Substanzen wurden schon klinisch getestet. Hier ist vor allem der monoklonale Antikörper Bevacizumab zu nennen, der gegen VEGF gerichtet ist. In einer klinischen Phase III-Erprobung stellte man unter Behandlung mit Bevacizumab einen signifikanten Überlebensvorteil für Patienten mit metastasiertem Kolonkarzinom fest {Hurwitz H, 2004}. Aufgrund der guten Studienergebnisse ist Bevacizumab als erste dieser antiangiogenen Substanzen in der Krebstherapie zugelassen worden. Auch über den inhibitorischen Effekt kleinmolekularer Substanzen, die am VEGF-Rezeptor angreifen, wurde berichtet {Ferrara N, 2003}. Die Inhibition der Angiogenese stellt also eine Erfolg versprechende Methode zur Bekämpfung des hepatozellulären Karzinoms dar.

3.5. Kombinierte Inhibition von B-Raf und VEGF-Rezeptor2 als antiproliferative und antiangiogenetische Strategie zur Behandlung des hepatozellulären Karzinoms

Wie in 3.3.3. und 3.4.2. bereits dargestellt, sind sowohl die Ras-Raf-MEK-ERK-Kaskade in den Tumorzellen als auch der VEGF-Signalweg in den Endothelzellen aussichtsreiche Angriffspunkte einer Therapie gegen das HCC. Da beide essentiell zur Proliferation und zum Wachstum des Tumors beitragen, könnte durch eine Hemmung dieser Strukturen ein

Wachstumsstopp erzielt werden. Bei beiden Signalwegen ließ sich in einzelnen Versuchen unter der Behandlung mit Inhibitoren antitumoröse Aktivität nachweisen {Roberts PJ, 2007; Semela D, 2004}. Allerdings scheint eine antiangiogenetische Monotherapie höchstens das Wachstum des Tumors stoppen zu können, ihn aber nicht vollständig zu eradizieren {Semela D, 2004}. Dies liegt vielleicht daran, dass die Karzinogenese ein vielschichtiger Prozess ist, der nicht allein durch eine Monotherapie bekämpft werden kann. Mit einer Therapie, die an mehreren Stellen angreift, könnte deshalb eventuell auch eine höhere Effektivität erzielt werden. Auf dieser Hypothese basieren die Ideen, einzelne Therapien zu kombinieren, bzw. kleinmolekulare Substanzen anzuwenden, die gleichzeitig an mehreren Punkten angreifen können {Roberts PJ, 2007}.

Eine dieser Substanzen ist das NVP-AAL881, ein oral verfügbarer kleinmolekularer Inhibitor der B-Raf-Kinase und des VEGF-Rezeptor-2. In einer präklinischen Studie konnte gezeigt werden, dass NVP-AAL881 die Proliferation und das Tumorwachstum von malignen Gliomen blockieren kann {Sathornsumetee S, 2006}. Außerdem wurde eine signifikante anti-neoplastische Aktivität des NVP-AAL881 bei Schilddrüsenkarzinomen mit Mutationen im B-Raf-Gen (V600E) *in vitro* und *in vivo* nachgewiesen {Mitsiades CS, 2007; Ouyang B, 2006}. Aufgrund dieser positiven Resultate wurde für die vorliegende Arbeit die Hypothese aufgestellt, dass das NVP-AAL881 auch bei anderen Karzinomarten wie zum Beispiel dem hepatozellulären Karzinom vergleichbare Ergebnisse erzielen könnte. Dementsprechend wurden die Wirkungen des Inhibitors NVP-AAL881 auf HCC-Zellen *in vitro* und *in vivo* untersucht. Es wurde postuliert, dass eine gleichzeitige Inhibition der B-Raf-Kinase und des VEGF-Rezeptor-2 sowohl die für den Tumor essentielle Signaltransduktionskaskade in HCC-Zellen blockiert als auch die Angiogenese durch direkte Wirkung an Endothelzellen und Gefäßmuskelzellen hemmt.

4. Material und Methoden

4.1. Geräte

Brutschrank	Heraeus, Hanau
Microplate Reader	MDS Analytical Technologies, Sunnyvale, CA, USA
Mikroskop	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Photometer	Eppendorf, Hamburg
Power Supply (Power Pac 300)	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Sterile Werkbank	Clean Air Engineering, Palatine, IL, USA
Thermomixer	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge (Biofuge fresco)	Heraeus, Hanau

4.2. Materialien

ART 10 Pipettenspitzen	Molecular BioProducts, San Diego, CA, USA
ART 20P Pipettenspitzen	Molecular BioProducts, San Diego, CA, USA
ART 200 Pipettenspitzen	Molecular BioProducts, San Diego, CA, USA
ART 1000E Pipettenspitzen	Molecular BioProducts, San Diego, CA, USA
Einmalküvette 1,5ml halbmikro	Brand GmbH & Co KG, Wertheim
96-well-Platte für Zellkultur	Corning Inc., Corning, NY, USA
Zellkulturflaschen 70ml/25cm ²	Becton Dickinson Labware Europe, Heidelberg
Zellkulturflaschen 250ml/75cm ²	Becton Dickinson Labware Europe, Heidelberg

4.3. Chemikalien

Aceton	Merck, Darmstadt
Acrylamide/bis-Acrylamide	Sigma-Aldrich, München
Ammoniumpersulfat	Sigma-Aldrich, München
Aquatex	Merck, Darmstadt
Bradford Reagent	Sigma-Aldrich, München
Bromodesoxyuridin (BrdU)	Sigma-Aldrich, München
Cremophor EL	Sigma-Aldrich, München
DAB	Merck, Darmstadt
Diff-Quick Reagenz	Dade Behring, Newark, NY, USA

DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma-Aldrich, München
ECL-Chemilumineszenz	GE Healthcare, Chalfont St.Giles, UK
Ethanol (absolut)	Mallinckrodt Baker B.V., Deventer, Holland
D-(+)-Glucose (99,5%)	Sigma-Aldrich, München
Glycin	Merck, Darmstadt
H ₂ O ₂	Merck, Darmstadt
Laemmli Sample Buffer	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, München
MTT	Sigma-Aldrich, München
Methanol	Merck, Darmstadt
Na ₃ VO ₄ (Natriumorthovanadat)	Sigma-Aldrich, München
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Normal Horse Serum	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
Normal Goat Serum	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
PMSF	Sigma-Aldrich, München
Precision Plus Protein Standards	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
2-Propanol	Merck, Darmstadt
Proteaseinhibitor (Complete Mini)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
TEMED	Carl Roth, Karlsruhe
Tissue Tek [®] OCT Compound	Sakura Finetek Inc., Torrance, CA, USA
Triton X-100 SigmaUltra	Sigma-Aldrich, München
Trockenmilchpulver	Carl Roth, Karlsruhe
Trypan Blue Solution (0,4%)	Sigma-Aldrich, München
Tween 20	Sigma-Aldrich, München

4.4. Antikörper und Wachstumsfaktoren

Primärantikörper

Name	Herkunft
Phospho-p44/42 MAP Kinase (Thr202/Tyr204) (phospho-ERK)	Cell Signaling Technologies, Danvers, MA, USA
p44/42 MAP Kinase (ERK)	Cell Signaling Technologies, Danvers, MA, USA
Phospho-MEK (Ser217/212)	Cell Signaling Technologies, Danvers, MA, USA
MEK	Cell Signaling Technologies, Danvers, MA, USA

phospho-STAT3 (Tyr705)	Cell Signaling Technologies, Danvers, MA, USA
STAT3	Cell Signaling Technologies, Danvers, MA, USA
β -Actin	Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, CA, USA
Ratten-anti-Maus CD-31/PECAM-1 Antikörper	Pharmingen, San Diego, CA, USA

Sekundärantikörper

Name	Herkunft
goat-anti-rabbit IgG-HRP	Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, CA, USA
rabbit-anti-goat IgG-HRP	Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, CA, USA
Peroxidase-konjugiertes Ziege-anti-Ratte IgG	Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, USA

Wachstumsfaktoren

Rekombinantes EGF	R&D Systems, Wiesbaden
Rekombinantes HGF	R&D Systems, Wiesbaden

4.5. Medien, Medienzusätze und andere Zellkulturreagenzien

Medien

DMEM-Medium	Invitrogen, Gibco, Karlsruhe mit 10% FCS, 1% Pen/Strep, 1% L-Glutamin, 1% Vitamine
RPMI 1640 Medium	Invitrogen, Gibco, Karlsruhe mit 20% FCS, 1% Pen/Strep, 1% L-Glutamin, 1% Vitamine, 1% ABAM
Smooth Muscle Cell Basal Medium 2	Promocell, Heidelberg
Endothelial Cell Growth Medium	Provitro GmbH, Berlin

Medienzusätze

ABAM (Antibiotikum, Antimykotikum)	Invitrogen, Gibco, Karlsruhe
FCS (Fötale Kälberserum)	Biochrom AG, Berlin
L-Glutamin	Biochrom AG, Berlin
Penizillin/Streptomycin	Biochrom AG, Berlin
Vitamine	Invitrogen, Gibco, Karlsruhe

Zellkulturenreagenzien

Dulbecco's PBS

PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich

0,5% Trypsin-EDTA

Invitrogen, Gibco, Karlsruhe

4.6. Zellkultur und NVP-AAL881

Die humanen HCC-Zelllinien Huh-7 und HepG2 stammten von der American Type Culture Collection (ATCC) (Manassas, VA, USA). Die Endothelzellen (Huvecs) und glatten Gefäßmuskelzellen (VSMCs) wurden bei Promocell (Heidelberg, Deutschland) erworben. Gezüchtet wurden die Huh-7-Zellen mit Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), in 5% CO₂ bei 37°C. Die HepG2-Zellen wuchsen mit RPMI-Medium, ebenfalls in 5% CO₂ bei 37°C. Für die Endothelzellen wurde Endothelial Cell Growth Medium verwendet und für die VSMCs Smooth Muscle Cell Basal Medium 2. Um konditioniertes Medium von Huh-7-Zellen zu erhalten, wurden die Huh-7-Zellen 48 Stunden mit 10% FCS-DMEM-Medium inkubiert, anschließend das Medium abgesaugt und zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand entnommen und bei -20°C gelagert.

Der kleinmolekulare Inhibitor NVP-AAL881 wurde freundlicherweise von Novartis Oncology (Cambridge, MA, USA) zur Verfügung gestellt. Für die *in vitro*-Experimente wurde der Inhibitor in einer Trägersubstanz (DMSO, 10nM) gelöst. Zum Gebrauch *in vivo* wurde NVP-AAL881 in 100%igem Ethanol zu einer Konzentration von 100 mg/ml gelöst und danach mit 5% D-(+)-Glukose und Cremophor auf 10 mg/ml verdünnt.

4.7. Western Blotting

Die Western Blot-Technik wurde benutzt, um den Effekt des NVP-AAL881 auf die Phosphorylierung der Proteine Erk, MEK und STAT3 zu untersuchen. Die Zellen wurden zu diesem Zweck bei einer 60-70%igen Zellkonfluenz verwendet. Je nach Versuchsweise wurden die Tumorzellen mit unterschiedlichen Konzentrationen von NVP-AAL881 für zwei, acht oder 20 Stunden inkubiert und teilweise für 15 Minuten mit Wachstumsfaktoren stimuliert (EGF: 40ng/ml bzw. HGF: 50ng/ml). Die Endothelzellen und VSMCs wurden außerdem nachfolgend mit konditioniertem Medium von Huh-7 für 20 Minuten inkubiert. Danach erfolgte die Lyse der Zellen mit Hilfe eines Lysepuffers (RIPA-B-Puffer, Proteininhibitor 10x, 0,1M Natriumorthovanadat und 20mM Phenylmethylsulfonylfluorid). Nach fünfzehnminütiger Zentrifugation (4°C, 13000rpm) wurde die Proteinkonzentration der Zelllysate mittels Bradford Reagent (500µl Bradford Reagent, 500µl Aqua dest., 1µl Probe) im Photometer bestimmt. Dann erfolgte mit den Proteinen (50µg) eine SDS-

Polyacrylamidgelelektrophorese zur Auftrennung der einzelnen Proteine mit 10%igen Laufgelen und 5%igen Sammelgelen. Hierfür wurde den Proben ein Laemmli-Puffer (5µl) zugefügt, sie wurden bei 95°C für 5 Minuten im Thermomixer erhitzt, kurz abzentrifugiert und auf das Gel aufgetragen. Nach dem Anschluss an einen Power Supply (100V) lief das Gel bis zum gewünschten Punkt. Daraufhin fand der Proteintransfer auf eine Nitrozellulosemembran statt, indem das Gel zusammen mit der Nitrozellulosemembran und Filterpapier in einem Elektrodenmodul, umgeben von vorgekühltem (4°C) Transferpuffer, geblottet wurde. Im Anschluss daran erfolgte die Inkubation mit den spezifischen Primärantikörpern (1:1000 in Trockenmilch) für phospho-Erk^{Thr202/Tyr204}, Erk, phospho-Mek^{Ser217/221}, Mek, phospho-STAT3^{Tyr705}, STAT3 und für β-Actin über Nacht bei 4°C. Mit Hilfe von HRP-gekoppelten Sekundärantikörpern (1:2500 in Trockenmilch für eine Stunde), die spezifisch an die Primärantikörper binden, und einem ECL-Kit, der eine Chemolumineszenzreaktion hervorrief, wurden die Proteine sichtbar gemacht.

4.8. MTT

Zum Nachweis des Effektes von NVP-AAL881 auf die Zellproliferation von Tumorzellen, Endothelzellen und Gefäßmuskelzellen wurde der MTT-Test angewandt. Dieser beruht auf der Reduktion des gelben MTT-Farbstoffes in ein blau-violettes Formazan durch die lebenden Zellen. Hierzu wurden die Huh-7-, Huvec- und VSMC-Zellen in eine 96-well-Platte ausplattiert (1x10³ Zellen pro Vertiefung). Am nächsten Tag wurden sie unterschiedlichen Konzentrationen von NVP-AAL881 für 24 und 48 Stunden ausgesetzt. Im Folgenden wurde Methylthiazoltetrazolium(MTT)-Lösung (125mg MTT in 50ml PBS, ergibt 2,5g/l) für eine Stunde dazugegeben, die Reaktion dann mit jeweils 100µl DMSO abgestoppt und anschließend der von den lebenden Zellen umgesetzte Farbstoff am Microplate Reader gemessen.

4.9. Migration

Um die Auswirkungen des NVP-AAL881 auf die Motilität der Tumorzellen *in vitro* zu untersuchen, wurden Migrationsexperimente mittels modifizierten Boyden Kammern (Becton Dickinson Bioscience, Heidelberg, Germany) durchgeführt. Dazu wurden die HCC-Zellen erst in 1% FCS-DMEM (100000 Zellen/ml) resuspendiert und daraufhin jeweils 5x10⁴ Zellen in die oberen Kammern der Boydenkammer gegeben, die einen Porendurchmesser von 8µm haben. In die unteren Kammern kamen als Chemoattractant je 750µl einer 10% FCS-DMEM-Lösung hinzu, je nach Versuch mit oder ohne NVP-AAL881 (2,5µM), HGF (50ng/ml) oder

EGF (40ng/ml). Nach 24 bzw. 48 Stunden wurden die migrierten Zellen fixiert und mit Diff-Quick Reagenz angefärbt. Danach erfolgte die Auszählung der durch die Poren gewanderten Zellen am Mikroskop in vier zufällig ausgewählten Feldern und die Berechnung des Durchschnittswertes (in den Abbildungen als cells/hpf angegeben). Für die Migration mit den Endothelzellen und Gefäßmuskelzellen wurde als Chemoattractant konditioniertes, aufbereitetes Medium von Huh-7-Zellen mit oder ohne NVP-AAL881 (2,5µM) verwendet.

4.10. Tierversuch

Um den Effekt des NVP-AAL881 auf das Tumorwachstum *in vivo* zu untersuchen, wurde ein subkutaner Tumormodell an Nacktmäusen durchgeführt. Alle Tierversuche unterlagen der Genehmigung des Institutional Animal Care and Use Committee der Universität Regensburg und der Ethikkommission der Universität Regensburg. Die sechs Wochen alten, männlichen Nacktmäuse (Balb/c) für die Experimente stammten von der Tierzuchtanstalt Charles River, Sulzfeld, in Deutschland. Alle Tiere wurden in der Tierhaltung des Forschungsbaus H4 am Klinikum der Universität Regensburg gehalten. Die Applikation der Huh-7-Zellen (1×10^6) geschah durch eine Injektion in die Subkutis in der rechten Flanke der Mäuse. Dann wurden die Mäuse randomisiert und entweder der Kontroll- oder der Behandlungsgruppe zugeteilt (n = 9-10/Gruppe). Die Behandlung begann am vierten Tag nach der Tumorzellimpfung, als die Tumoren eine tastbare Größe angenommen hatten. Sie bestand aus der täglichen oralen Gabe von 100mg/kg NVP-AAL881 über eine Schlundsonde. Jeden zweiten Tag wurden die Tumordurchmesser gemessen und die Tumorumfänge über die Formel $\text{Breite}^2 \times \text{Länge} \times 0,5$ berechnet. Am 18. Tag wurde das Experiment beendet, die subkutanen Tumoren herausgeschnitten, gewogen und für immunhistochemische Versuche weiterverarbeitet.

4.11. Immunhistochemische Untersuchungen

Für die immunhistochemischen Versuche bedeckte man die Tumoren nach der Entnahme aus den Mäusen mit Tissue Tek und kryofixierte sie in flüssigem Stickstoff. Anschließend wurden von jeder Gewebeprobe mehrere Kryoschnitte von je 8µm Dicke angefertigt und auf einen Objektträger aufgetragen.

4.11.1. CD-31 positive Gefäßfläche

CD-31 ist ein Zelloberflächenmolekül, welches unter anderem auf Endothelzellen expremiert wird. Zur Darstellung CD-31 positiver Gefäßflächen wurden ein endothelspezifischer Ratten-anti-Maus CD-31/PECAM-1 Antikörper und als Sekundärantikörper ein Peroxidase-

konjugiertes Ziege-anti-Ratte IgG verwendet. Die Versuche begannen mit der Fixierung der Gewebeschnitte. Jede Probe wurde erst in kaltem, 100%igem Aceton, dann in einer Aceton-Chloroform-Mischung (im Verhältnis 1:1) und wiederum in 100%igem Aceton fixiert. Daraufhin erfolgte das Waschen der Schnitte in PBS. Als nächstes wurden die Proben mit 3% H₂O₂ in Methanol für 12 Minuten inkubiert, um die endogene Peroxidase zu blockieren und somit unspezifische Reaktionen zu vermeiden. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit PBS fand eine 20minütige Inkubation mit Proteinblocklösung (1% Normal Goat Serum, 5% Normal Horse Serum, PBS) statt, um unspezifische Antikörperbindungen zu verhindern. Im Folgenden wurde der Primärantikörper (1:800 gelöst in Proteinblocklösung) hinzugefügt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Nachdem die Proben erneut mit PBS gewaschen waren, wurden sie am nächsten Tag für 10 Minuten der Proteinblocklösung ausgesetzt, um anschließend mit dem Sekundärantikörper (1:200 gelöst in Proteinblocklösung) für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert zu werden. Als nächstes folgte wieder ein dreimaliges Waschen in PBS und danach die Inkubation mit DAB (Diaminobenzidin), um die Antikörperbindung sichtbar zu machen. Durch Waschen mit destilliertem Wasser wurde die Reaktion gestoppt. Nachdem die Schnitte mit Aquatex eingedeckt worden waren, wurden am Mikroskop (bei 40facher Vergrößerung) jeweils Bilder aus vier verschiedenen Quadranten eines jeden Tumors erstellt. Zur Quantifizierung der CD-31 positiven Gefäßflächen wurde die ImageJ Software verwendet (Version 1.33; National Institute of Health, Bethesda, MD, USA).

4.11.2. Tumorzellproliferation-Nachweis mittels BrdU

Diese immunhistochemische Untersuchung beruht auf dem Einbau des BrdU (Bromodesoxyuridin) in die DNA proliferierender Zellen anstelle des Thymidin. Zu diesem Zweck wurde den Mäusen zwei Stunden vor Beendigung des Mäuseexperiments eine intraperitoneale Injektion BrdU (1 mg/Maus) verabreicht. Um das aufgenommene BrdU in den proliferierenden Zellen sichtbar zu machen, wurde ein BrdU-Detection-Kit der Firma Becton Dickinson Biosciences, Heidelberg, verwendet. Wie nach Herstellerprotokoll wurden die Kryoschnitte der Tumoren fixiert, blockiert, das eingebaute BrdU durch Denaturierung der DNA demaskiert und der primäre Anti-BrdU-Antikörper dazugegeben. Nach der Inkubation mit Streptavidin-HRP wurde die Antigen-Antikörper-Bindung durch Zugabe von DAB sichtbar gemacht. Schließlich wurden die BrdU-positiven Tumorzellen am Mikroskop bei 40facher Vergrößerung in jeweils vier Feldern eines Tumorschnitts ausgezählt und der Durchschnittswert berechnet.

4.12. Statistik

Alle statistischen Berechnungen erfolgten mit Hilfe von SigmaStat (Version 3.0). Die Ergebnisse der *in vivo* Experimente wurden anhand des Grubb's Tests auf signifikante Ausreißer überprüft (www.graphpad.com). Die statistische Signifikanz tumorassoziierter Variablen von *in vivo* Untersuchungen wurde mit dem Mann-Whitney U Test für nicht-parametrische Daten bestimmt. Zur Analyse von *in vitro* Daten wandte man den T-Test für zwei unabhängige Stichproben an. Soweit nicht anders im Bildtext erwähnt, sind alle Ergebnisse statistischer Berechnungen als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes angegeben.

5. Ergebnisse

5.1. Auswirkungen des NVP-AAL881 auf Tumorzellen *in vitro*

5.1.1. Effekt des NVP-AAL881 auf die Proliferation der HCC-Zellen

Um die Auswirkungen einer gemeinsamen B-Raf- und VEGF-Rezeptor 2-Blockade auf HCC-Zellen *in vitro* zu bestimmen, wurden Huh-7- und HepG2-Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen des NVP-AAL881 inkubiert. Das Wachstumsverhalten untersuchten wir mittels MTT-Tests. Dabei stellte sich heraus, dass das NVP-AAL881 zu einer dosisabhängigen Inhibition der Proliferation der HCC-Zellen nach 48 Stunden führt (vgl. Abb.2a). Nach 24 Stunden dagegen war noch keine signifikante Reduktion des Wachstums zu beobachten. Wurden die Tumorzellen jedoch unter veränderten Bedingungen mit reduziertem Serum (1% FCS) inkubiert, so war auch nach 24 Stunden schon eine bedeutende Hemmung des Wachstums auszumachen. Unter diesen Konditionen verstärkte sich sogar noch der wachstumshemmende Effekt nach 48 Stunden im Vergleich zum 10%igen Serum (vgl. Abb.2b).

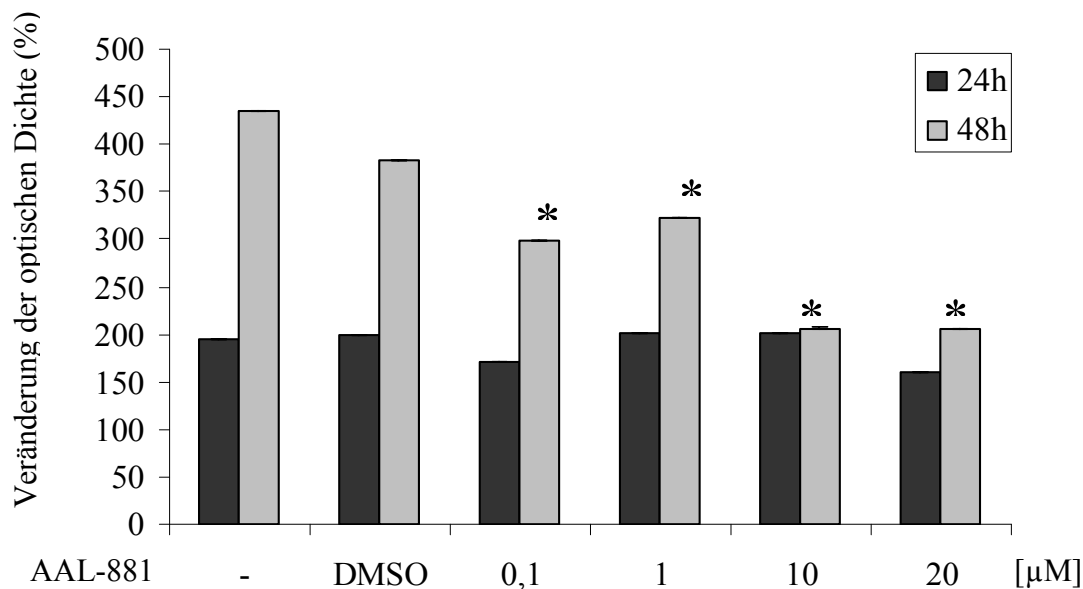
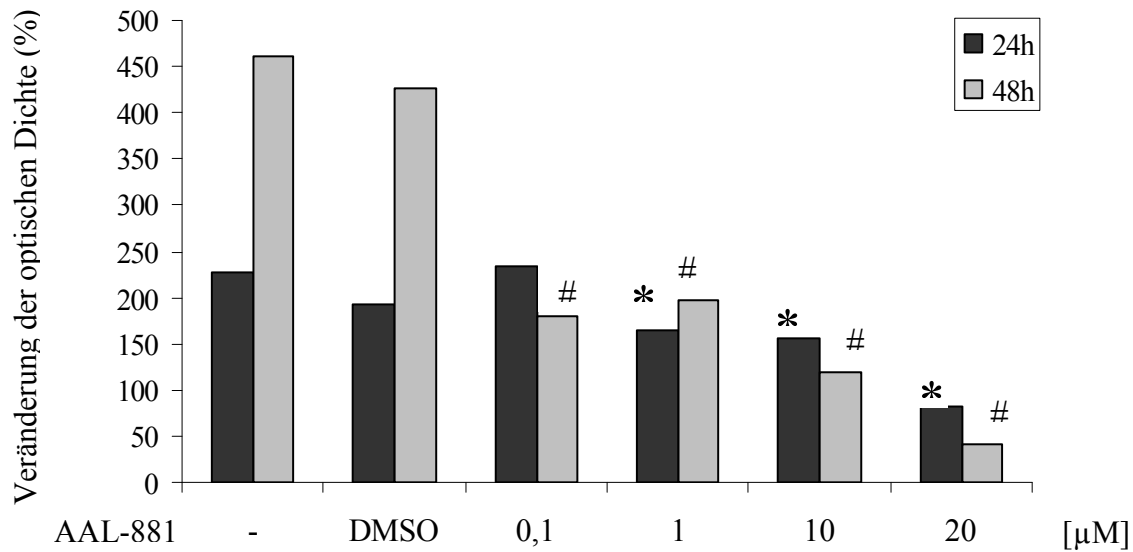


Abb. 2: MTT-Test zur Analyse der Zellproliferation. Dargestellt sind die Veränderungen der optischen Dichte des von den Zellen umgesetzten Farbstoffes in Huh-7-Zellen, die mit verschiedenen Konzentrationen von NVP-AAL881 behandelt wurden.

a.) Inkubation der Zellen mit 10%igem FCS Serum. Nach 48 Stunden ist bei Behandlung mit NVP-AAL881 eine signifikante (* $p < 0,05$) Inhibition der HCC-Zellproliferation sichtbar.



b.) Inkubation der Zellen mit 1%igem FCS-Serum. Sowohl nach 24 (* $p < 0,05$) als auch nach 48 Stunden ([#] $p < 0,05$) ist eine Hemmung der Zellproliferation erkennbar.

5.1.2. Einfluss des NVP-AAL881 auf die Aktivierung von Signalwegen

Die direkte Beeinflussung der Signalwege *in vitro* durch das NVP-AAL881 wurde mit Western Blot-Untersuchungen dargestellt. Die Inkubation der HCC-Zellen mit ansteigenden Konzentrationen von NVP-AAL881 für 20 Stunden resultierte in einer Inhibition der Phosphorylierung der Proteine ERK, MEK und STAT3, die von der Dosis des NVP-AAL881 abhängig war (vgl. Abb.3). Zusätzlich wurde eine verminderte Expression des STAT5 festgestellt. In einem Zeitkurs mit NVP-AAL881 (2, 8 und 24 Stunden Inkubation) zeigte sich, dass die Phosphorylierung des STAT3 zu jedem Zeitpunkt im Vergleich zur Kontrolle herabgesetzt war (vgl. Abb.4). Dies lässt darauf schließen, dass eine Blockade der B-Raf-Kinase zu einer verminderten Aktivierung des STAT3 führt. Außerdem war bei einer achtstündigen Inkubation der HCC-Zellen mit NVP-AAL881 auch die Phosphorylierung der ERK-Kinase vermindert.

Als nächstes wurde der Effekt des B-Raf-Inhibitors auf die Aktivierung von ERK und STAT3 in Abhängigkeit des Wachstumsfaktors EGF untersucht. EGF gilt als bekannter Aktivator des Ras-Raf-MEK-ERK-Signaltransduktionsweges, erkennbar in einer verstärkten Phosphorylierung der Komponenten der Signalkaskade. Mittels Western Blot wurde nun nachgewiesen, dass es bei der Inhibition der B-Raf-Kinase durch NVP-AAL881 (2µM) zu einer Unterbrechung der EGF-induzierten Phosphorylierung sowohl der ERK-Kinase als auch des STAT3 kommt (vgl. Abb.5).

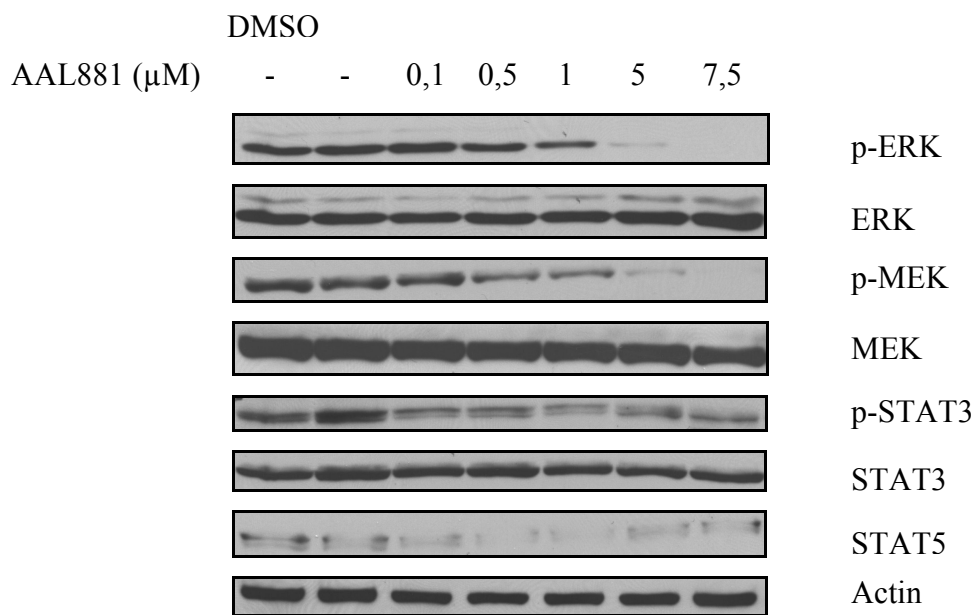


Abb. 3: Western Blot von Huh-7-Zellen, die für 20 Stunden mit ansteigenden Konzentrationen von NVP-AAL881 inkubiert wurden. Es zeigte sich eine deutliche Inhibition der Phosphorylierung von ERK, MEK und STAT3, sowie eine verminderte Expression von STAT5.

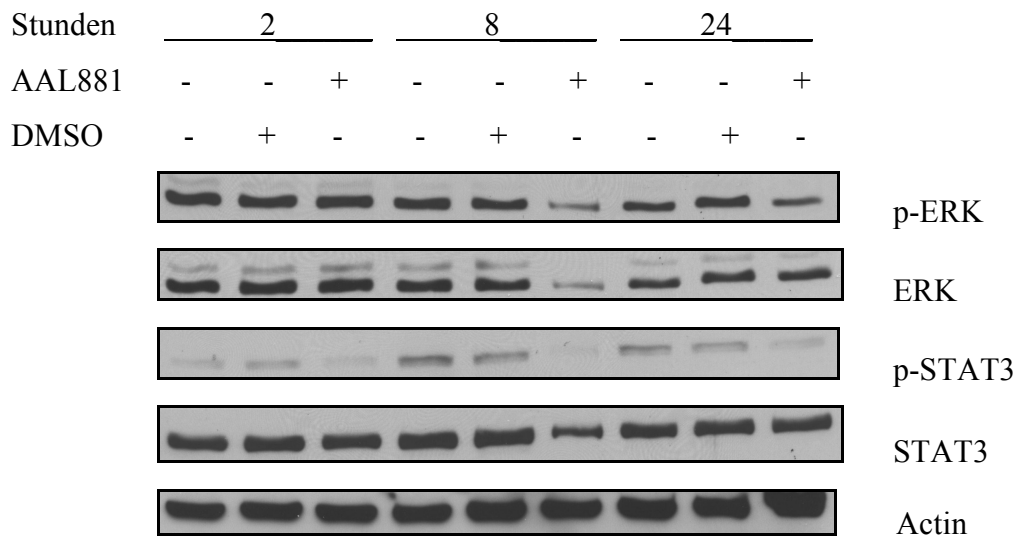


Abb. 4: Western Blot von Huh-7-Zellen, die nach einem Zeitschema (2, 8 und 24 Stunden) mit NVP-AAL881(2µM) behandelt wurden. Die Phosphorylierung des ERK ist nach 8 Stunden NVP-AAL881-Behandlung herabgesetzt, die von STAT3 bereits nach 2 Stunden.

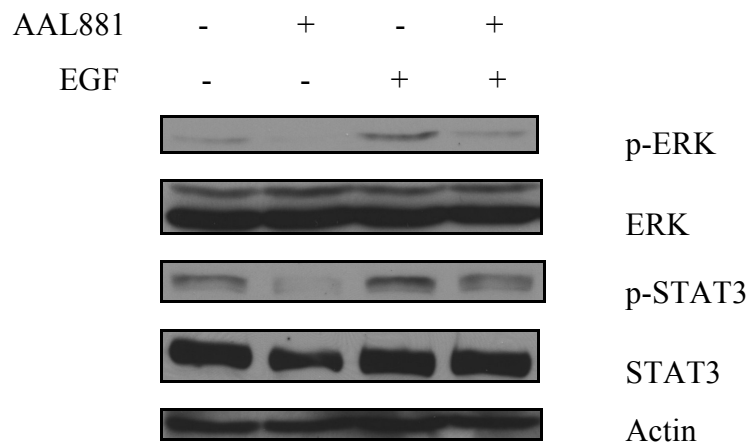


Abb. 5: Western Blot von Huh-7-Zellen, die für 20 Stunden mit NVP-AAL881 (2 μ M) behandelt und anschließend mit EGF (40ng/ml) stimuliert wurden. Unter NVP-AAL881-Behandlung ist eine deutliche Reduktion der basalen und der EGF-induzierten Aktivierung des ERK und des STAT3 sichtbar.

5.1.3. Effekt des NVP-AAL881 auf die Tumorzelle - Migration

Da über die Raf-Kinase auch die Migration gesteuert wird, vermuteten wir in diesem Bereich ebenfalls einen Einfluss des NVP-AAL881. Dies bestätigte sich in den Migrationsversuchen mit den HCC-Zellen. Tatsächlich zeigte sich unter NVP-AAL881 (2 μ M) eine signifikante Reduktion der basalen Migration sowohl bei Huh-7- als auch bei HepG2-Zellen im Vergleich zur Kontrolle. Des Weiteren stellte sich heraus, dass die Wachstumsfaktoren HGF und EGF beide die Tumorzellmigration *in vitro* induzieren. Wurden die mit HGF- und EGF-stimulierten Zellen jedoch auch noch dem NVP-AAL881 ausgesetzt, so reduzierte sich die Migration wieder signifikant (vgl. Abb. 6 und 7).

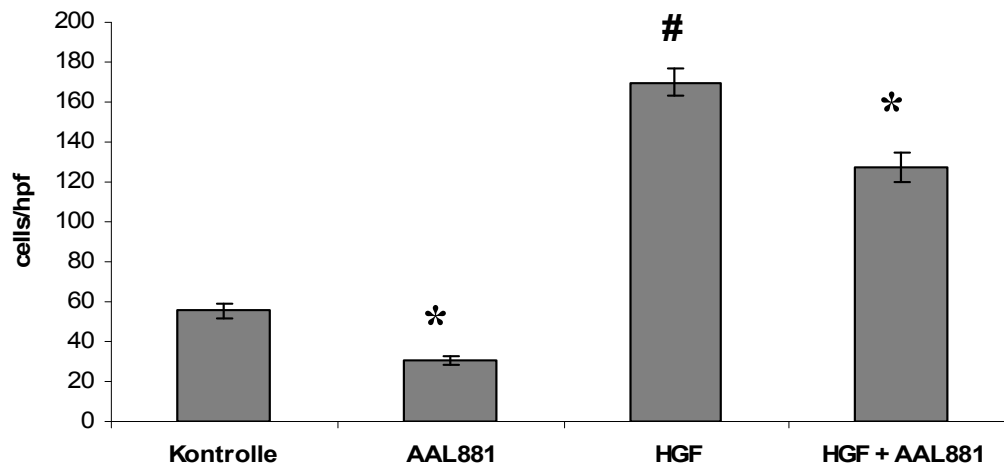


Abb. 6: Anzahl der durch die Boyden-Kammern migrierten Huh-7-Zellen nach Stimulation mit HGF (50ng/ml) oder NVP-AAL881 (2,5µM), die am Mikroskop nach 24 Stunden in vier zufälligen Feldern ausgezählt wurden (cells/hpf). HGF induzierte signifikant ([#]p<0,05) die Tumorzellmigration in vitro. Die Behandlung mit NVP-AAL881 führte zu einer Inhibition der basalen und der HGF-induzierten Migration (*p<0,05 für beide).

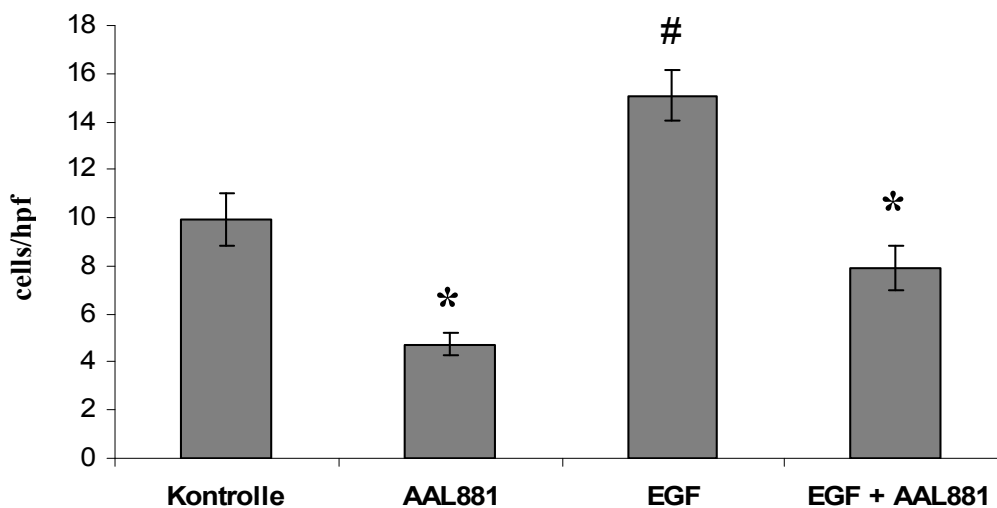


Abb. 7: Anzahl der migrierten Huh-7-Zellen nach Stimulation mit EGF (40ng/ml) oder NVP-AAL881 (2,5µM) nach 24 Stunden. EGF induzierte signifikant ([#]p<0,05) die HCC-Zellmigration. Bei Inkubation mit NVP-AAL881 wurde die basale und EGF-induzierte Migration signifikant (*p<0,05) vermindert.

5.2. Auswirkungen des NVP-AAL881 auf Endothelzellen und Gefäßmuskelzellen *in vitro*

5.2.1. Effekt des NVP-AAL881 auf die Proliferation der Endothelzellen und VSMCs

Um die Auswirkungen des B-Raf- und VEGF-Rezeptor2-Inhibitors auf die Angiogenese zu untersuchen, führten wir Versuche mit Endothelzellen und Gefäßmuskelzellen durch. In MTT-Tests konnte man unter der Behandlung von NVP-AAL881 sowohl nach 24 als auch nach 48 Stunden eine dosisabhängige Hemmung der Endothelzellproliferation feststellen (vgl. Abb. 8). Im Gegensatz dazu zeigte das NVP-AAL881 nur geringe Effekte auf das Wachstumsverhalten der Gefäßmuskelzellen (vgl. Abb. 9).

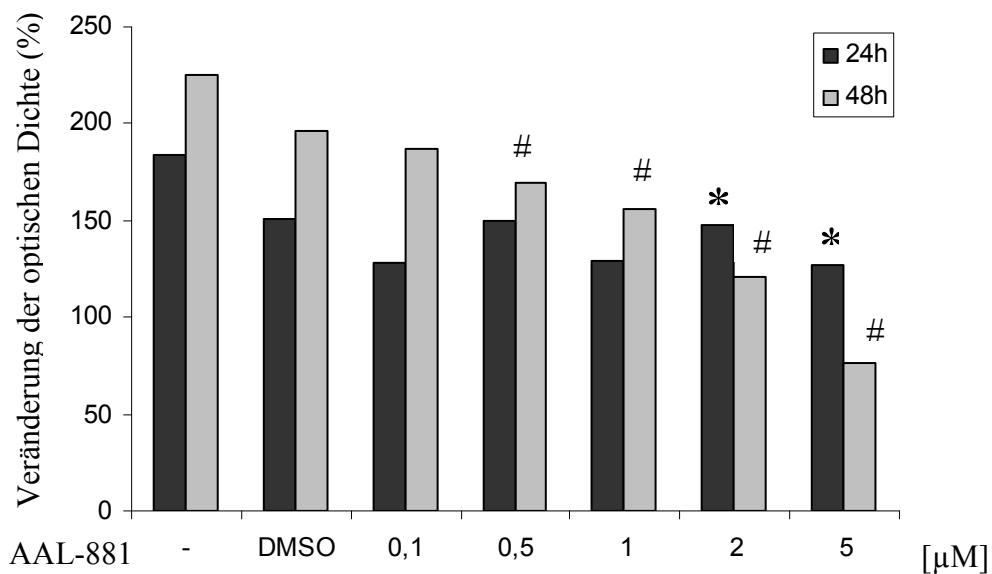


Abb. 8: MTT-Test zur Analyse der Zellproliferation von Endothelzellen. Die Zellen wurden für 24 und 48 Stunden mit ansteigenden Konzentrationen von NVP-AAL881 inkubiert. Sowohl nach 24 (* $p < 0,05$) als auch nach 48 Stunden (# $p < 0,05$) ist eine Inhibition der Endothelzellproliferation sichtbar.

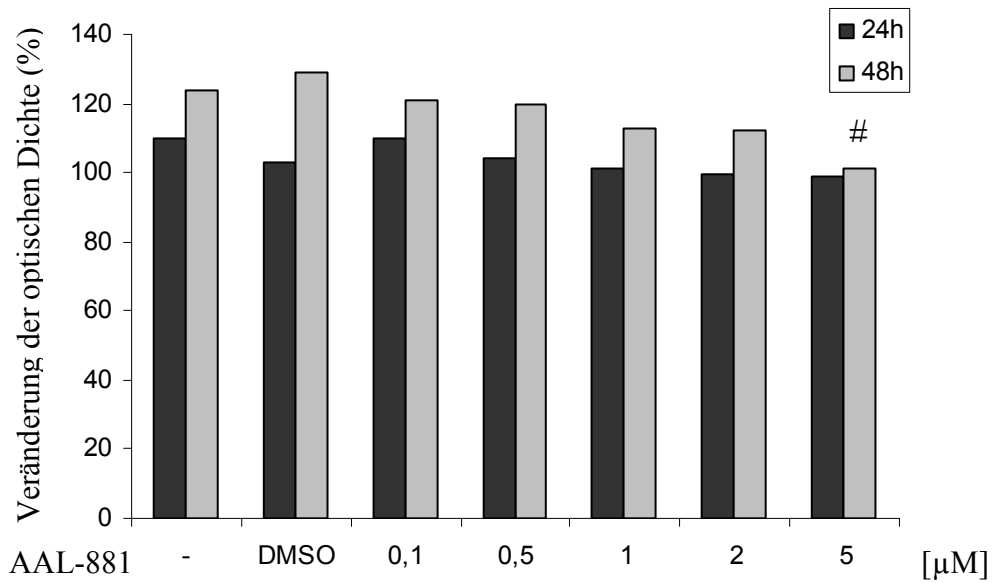


Abb. 9: MTT-Test zur Untersuchung der Zellproliferation von Gefäßmuskelzellen. Inkubation der Zellen für 24 und 48 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen von NVP-AAL881. Hier ist eine signifikante Wachstumsreduktion bei Behandlung mit NVP-AAL881 nur nach 48 Stunden bei hohen Konzentrationen erkennbar ([#]p<0,05).

5.2.2. Einfluss des NVP-AAL881 auf die Migrationsfähigkeit der Endothel- und Gefäßmuskelzellen

Wie in 5.1.3. dargestellt, konnte bewiesen werden, dass durch das NVP-AAL881 die Migration der HCC-Zellen inhibiert wird. Ob dies auch bei Endothel- und Gefäßmuskelzellen der Fall ist, sollte nun untersucht werden. Um außerdem ein Milieu zu schaffen, das demjenigen von HCC-Tumoren entspricht, wurde konditioniertes Medium von Huh-7-Zellen für die Migrationsversuche verwendet. Im Endeffekt zeigte sich sowohl bei den Endothel- als auch bei den Gefäßmuskelzellen eine deutliche Reduktion der Migration unter Einfluss des NVP-AAL881, verglichen mit der Kontrollgruppe, die nur konditioniertes Medium, nicht jedoch NVP-AAL881 enthielt. Dieser Effekt war nicht nur nach 48 Stunden, sondern auch schon nach 24 Stunden nachzuweisen (vgl. Abb. 10).

Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass die Signalinhibition durch NVP-AAL881 auch für eine Beeinflussung der Angiogenese *in vivo* effektiv sein könnte.

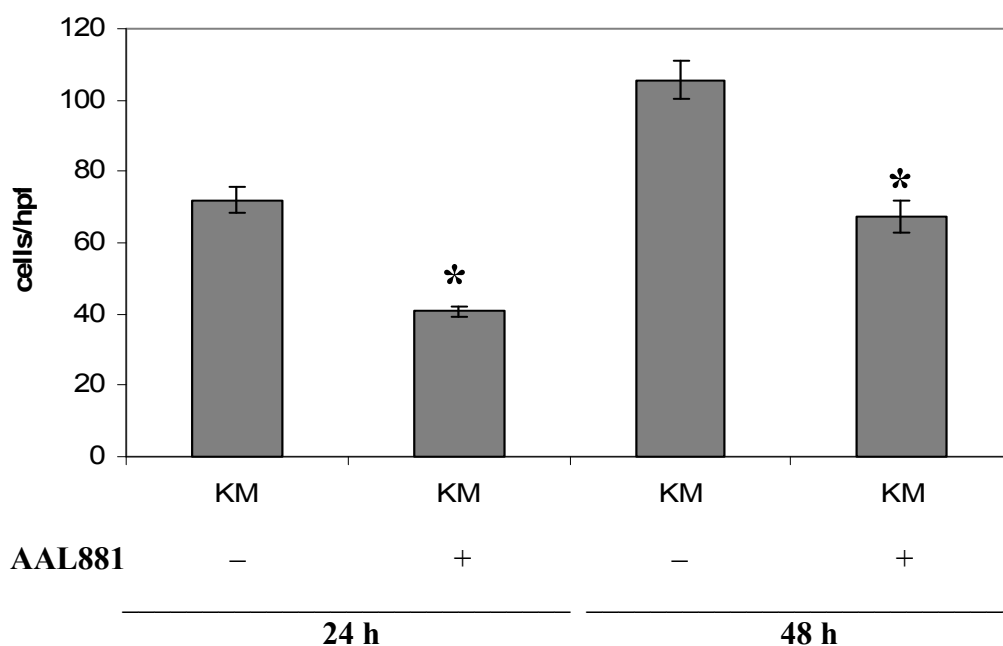


Abb. 10: Anzahl der durch die Boyden-Kammern migrierten Endothelzellen (Huvecs) nach Stimulation mit konditioniertem Medium (KM) und Behandlung mit NVP-AAL881 (2 μ M) nach 24 und 48 Stunden. Nach B-Raf- und VEGFR2-Inhibition resultierte eine signifikante (* $p < 0,05$) Reduktion gegenüber den Kontrollgruppen.

5.2.3. Effekt des NVP-AAL881 auf die Signalfähigkeit der Endothelzellen

Da sich deutliche Auswirkungen des B-Raf- und VEGF-Rezeptor2-Inhibitors auf die Migration und die Proliferation der Endothel- und Gefäßmuskelzellen bestätigten (vgl. 5.2.1. und 5.2.2.), stellte sich die Frage, ob auch direkt die Signaltransduktion in diesen Zellen durch das NVP-AAL881 *in vitro* beeinflusst wird. Auch hier untersuchten wir zuerst den Effekt des konditionierten Mediums der Tumorzellen auf die Endothelzellen und entdeckten, dass das konditionierte Medium zu einer Aktivierung des STAT3 in Endothelzellen führte. Die Zellen wurden also durch das Medium der Tumorzellen stimuliert. Inkubierte man die Endothelzellen jedoch vorher mit NVP-AAL881 (2 μ M), so verringerte sich die Phosphorylierung und damit auch die Aktivierung des STAT3 wieder (vgl. Abb. 11).

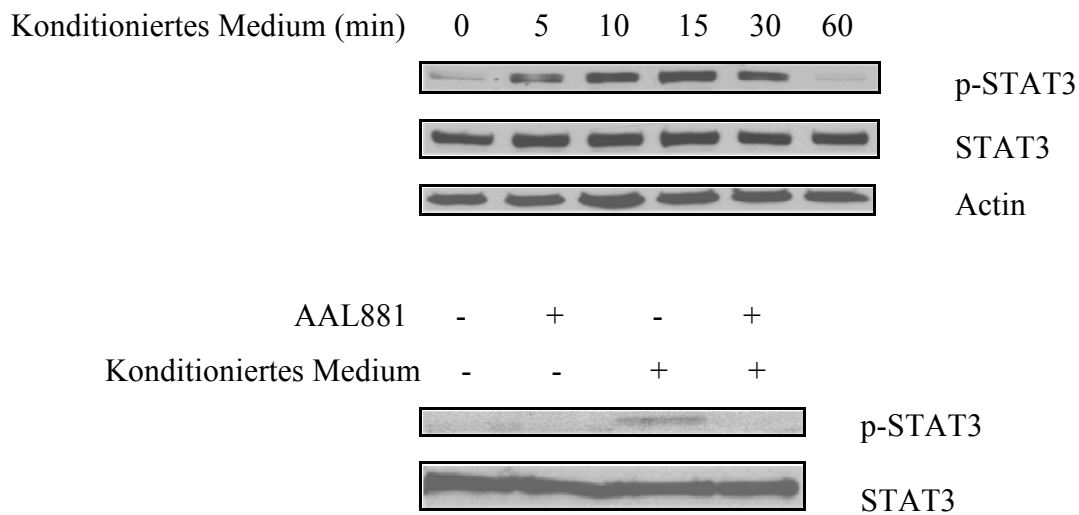


Abb. 11: Western Blot von Endothelzellen, die für unterschiedliche Zeiten mit konditioniertem Medium von Huh-7-Zellen stimuliert wurden. Es resultierte eine Phosphorylierung des STAT3. Unter Vorbehandlung mit NVP-AAL881 (2 μ M) wurde diese Phosphorylierung wieder reduziert.

5.3. Auswirkungen des NVP-AAL881 auf Tumorzellen *in vivo*

5.3.1. Effekt des NVP-AAL881 auf das Wachstum des HCCs *in vivo*

Um die Ergebnisse der kombinierten B-Raf- und VEGF-Rezeptor2-Blockade aus den *in vitro*-Versuchen weiter zu verifizieren, führten wir ein subkutanen Tumormodell an Nacktmäusen durch. Von diesem Experiment wurde erwartet, bei Anwendung des kleinmolekularen Inhibitors ebenfalls wie *in vitro* eine Hemmung des Wachstums des HCCs nachweisen zu können. Tatsächlich reduzierte sich das Wachstum der Karzinome unter Behandlung der Mäuse mit NVP-AAL881 (100mg/kg/Tag) signifikant, im Vergleich zu den Tumoren der Kontrollgruppe, die nicht mit NVP-AAL881 therapiert wurden (vgl. Abb. 12). Dieser wachstumshemmende Effekt wurde nochmals anhand der endgültigen Gewichte der Tumoren bestätigt, die bei Behandlung der Mäuse mit NVP-AAL881 deutlich unter den Gewichten der Kontrollmäusetumoren lagen (vgl. Abb. 13).

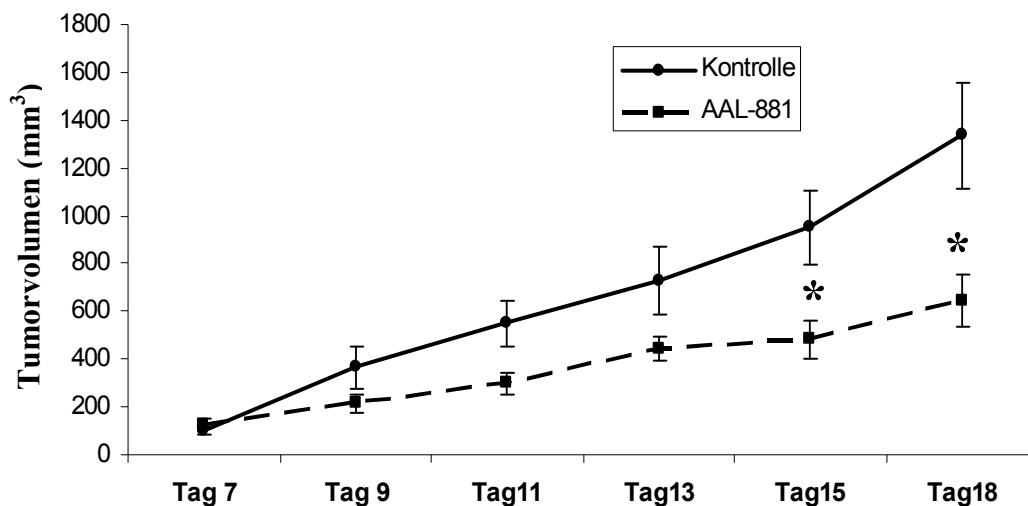
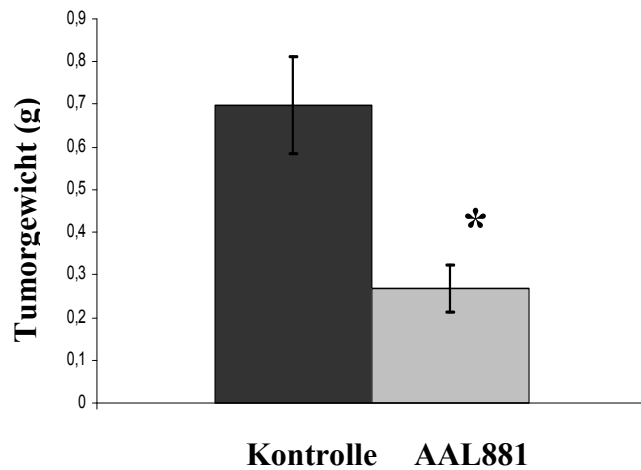
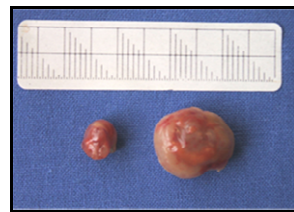


Abb. 12: Tumorumfängen der subkutanen HCCs im Verlauf des Versuchs unter Behandlung mit NVP-AAL881, verglichen mit der Kontrollgruppe. Die mit NVP-AAL881 behandelten Tumoren zeigten eine signifikante (* $p < 0,05$) Wachstumsreduktion.



AAL881 Kontrolle



AAL881 Kontrolle

Abb. 13: Durchschnitts-Tumorgewicht der subkutanen HCCs, die mit NVP-AAL881 behandelt wurden, im Vergleich zu den Durchschnitts-Tumorgewichten der Kontrollgruppe. Das Gewicht der NVP-AAL881 behandelten Karzinome ist signifikant geringer als das der Kontrollkarzinome (* $p < 0,05$). Links unten ist ein Foto von zwei der subkutanen HCC-Tumoren in den rechten Flanken der Mäuse abgebildet. Das Foto daneben zeigt die herauspräparierten Karzinome im Größenvergleich.

5.3.2. Einfluss des NVP-AAL881 auf die Angiogenese *in vivo*

Nicht nur die Beeinflussung des Wachstums durch Inhibition von B-Raf und VEGF-Rezeptor-2 bestätigte sich in den *in vivo*-Versuchen, es zeigten sich auch Auswirkungen des NVP-AAL881 auf die Gefäßbildung der Tumoren. Mithilfe der immunhistochemischen Untersuchungen konnte man eine deutliche Reduktion der CD-31-positiven Gefäßfläche bei den mit NVP-AAL881 behandelten Tumoren feststellen, verglichen mit den Karzinomen der Kontrollmäuse (vgl. Abb. 14). Dies lässt auf eine direkte Hemmung der Angiogenese schließen.

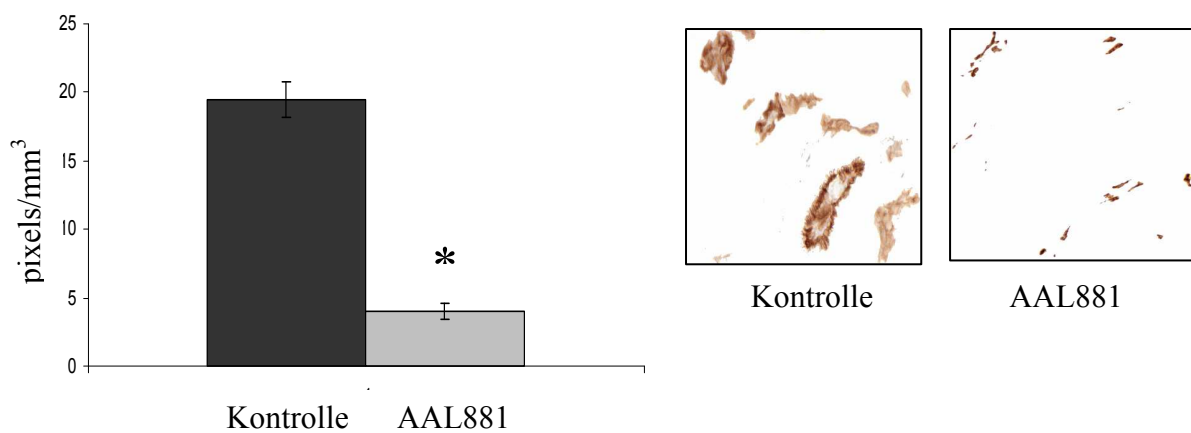


Abb. 14: Anteil der CD-31-positiven Gefäßfläche *in vivo* nach immunhistochemischer Analyse. In den HCC-Tumoren, die mit NVP-AAL881 behandelt wurden, ist die Anzahl an CD-31-positiven Gefäßen signifikant geringer als in den Kontrolltumoren (* $p < 0,05$). Rechts in der Abbildung sind mikroskopische Bilder der CD-31-gefärbten Gewebeschnitte zu sehen.

5.3.3. Effekt des NVP-AAL881 auf die Proliferation *in vivo*

Die Erkenntnis der Wachstumshemmung aus den *in vitro*-Versuchen und dem geminderten Tumorgewicht *in vivo* ließ sich auch immunhistochemisch nachweisen. Die Anzahl der proliferierenden BrdU-positiven Tumorzellen war in den mit NVP-AAL881 behandelten HCCs geringer als in den Kontrollkarzinomen (vgl. Abb. 15).

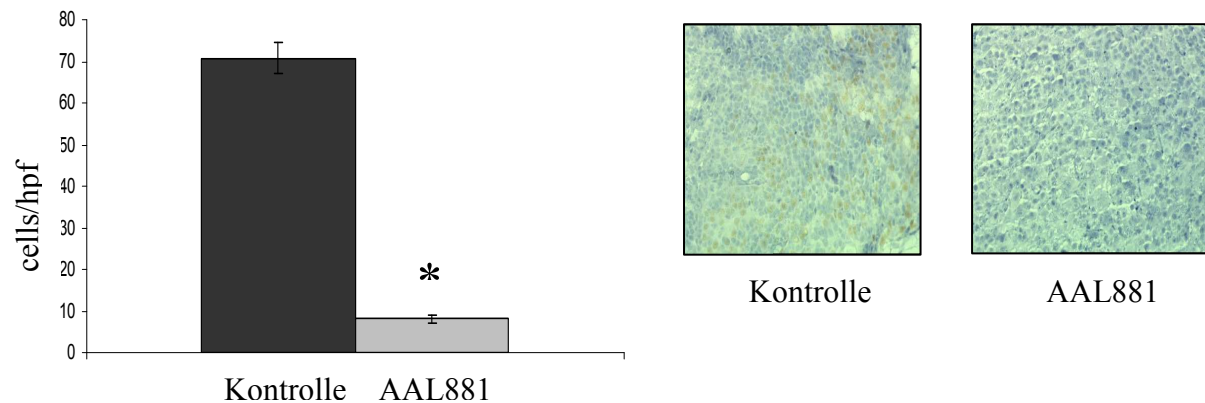


Abb. 15: Anzahl der BrdU-positiven Tumorzellen *in vivo* nach immunhistochemischer Färbung der Gewebeschnitte. Das Diagramm zeigt, dass die BrdU-positiven Zellen und somit die Proliferation in den mit Raf/VEGFR2-Inhibitor behandelten HCCs vermindert sind (* $p < 0,05$), verglichen mit den Kontrolltumoren. Rechts in der Abbildung sind mikroskopische Bilder der BrdU-gefärbten Gewebeschnitte wiedergegeben.

6. Diskussion

Anhand der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass die gleichzeitige Inhibition der B-Raf-Kinase und des VEGF-Rezeptor-2 eine effektive Methode darstellt, um das Tumorwachstum und die Vaskularisation des hepatozellulären Karzinoms zu hemmen.

6.1. Inhibition der HCC-Proliferation

Im Rahmen der neuen molekularen Therapieansätze geriet auch die Raf-Kinase in den Fokus der Aufmerksamkeit um neuartige Behandlungsmöglichkeiten. Ihre Beteiligung gemeinsam mit der Ras-Raf-MEK-ERK-Signaltransduktionskaskade an der Tumorzellproliferation und Tumorprogression ist ausdrücklich erwiesen. Darum stellt die Raf-Kinase einen viel versprechenden Angriffspunkt bei der Therapie des HCCs dar (siehe 3.3.3.). In dieser Studie untersuchten wir die Wirkungen eines neuen B-Raf- und VEGF-Rezeptor-2-Inhibitors, des NVP-AAL881, auf das Tumorwachstum und die Vaskularisation des HCCs. Bisher wurde sowohl in malignen Gliomen als auch in Schilddrüsenkarzinomen eine antitumoröse Aktivität des NVP-AAL881 festgestellt, insbesondere wenn diese Tumoren B-Raf-Mutationen aufwiesen {Sathornsumetee S, 2006; Mitsiades CS, 2007; Ouyang B, 2006}. In diesen Studien verursachte NVP-AAL881 eine deutliche Reduktion der Phosphorylierung der Kinasen MEK und ERK in den Karzinomzelllinien. Unsere Ergebnisse zeigen nun die gleichen Effekte in HCC-Zelllinien. NVP-AAL881 ist tatsächlich in der Lage, die B-Raf-Kinase im hepatozellulären Karzinom zu hemmen und die Signalweiterleitung via MEK und ERK zu blockieren. Dies funktionierte nicht nur im Basalzustand, sondern auch nach Aktivierung der Kinasen durch den Wachstumsfaktor EGF. Dies lässt auf eine besonders gute Wirksamkeit des NVP-AAL881 schließen, da die HCCs meist einen hochregulierten EGF-Rezeptor besitzen und häufig durch EGF stimuliert werden {Pang R, 2007}. Des Weiteren konnten wir zeigen, dass der kleinmolekulare Inhibitor NVP-AAL881 das Wachstum der HCC-Zellen *in vitro* hemmt. Auch dieser Effekt wurde schon in Zelllinien von Schilddrüsenkarzinomen und malignen Gliomen beobachtet {Sathornsumetee S, 2006; Ouyang B, 2006}. Diese Entdeckung bestätigte sich in unseren *in vivo*-Versuchen, in denen sich das Wachstum der Karzinome unter der Behandlung mit NVP-AAL881 signifikant reduzierte, im Vergleich zu den Karzinomen der Kontrollmäuse. Verifiziert wurde die Wachstumshemmung durch das geringere Gewicht der NVP-AAL881-therapierten Tumore.

Es ist nahe liegend, dass die Raf-Inhibition und das dadurch beeinflusste MEK dies verursacht, da schon in anderen Studien eine Hemmung der Zellproliferation von HCC-Zellen *in vitro* durch eine Inhibition der MEK-Kinase nachgewiesen wurde {Wiesenauer CA, 2004}. Abschließend bestätigen alle diese Ergebnisse die Wirksamkeit des B-Raf-Inhibitors NVP-AAL881 auf die Proliferation des hepatozellulären Karzinoms.

6.2. Einfluss auf STAT3 und Migration

Wie schon in 3.4.1. erwähnt, spielt der Transkriptionsfaktor STAT3 eine bedeutende Rolle in der Angiogenese des hepatozellulären Karzinoms. Die aktivierte, phosphorylierte Form von STAT3 (Tyr705) steht in Zusammenhang mit der Gefäßdichte des HCCs und einem verkürzten Überleben der Karzinom-Patienten {Yang SF, 2007}. Doch der Transkriptionsfaktor hat nicht nur direkten Einfluss auf die Angiogenese, sondern ist auch an anderen Prozessen der Onkogenese beteiligt. Er hemmt in aktivierter Form die Apoptose und fördert die Tumorzellproliferation {Li WC, 2006}. Wir fanden nun heraus, dass eine Inhibition der B-Raf-Kinase und des VEGF-Rezeptors2 mithilfe des NVP-AAL881 auch die Aktivierung des Transkriptionsfaktors STAT3 im hepatozellulären Karzinom herabsetzt. Dies zeigte sich sowohl konstitutiv als auch nach einer EGF-induzierten Phosphorylierung. Daraus lässt sich auf einen Einfluss des NVP-AAL881 auf onkogene Prozesse über Regulierung des STAT3 schließen. Diese Regulierung des STAT3 ist zusätzlich von besonderem Interesse, da präklinische Daten vermuten lassen, dass eine Blockierung des STAT3 die Sensitivität bei einer Chemotherapie verbessert und die Proliferation von HCC-Zelllinien vermindert {Choudhari SR, 2007; Lau CK, 2007}. Außerdem werden durch eine STAT3-Inhibition die Metastasierung und das Tumorwachstum des hepatozellulären Karzinoms erheblich reduziert, wie Li mit seiner Forschergruppe herausfand {Li WC, 2006}. Um den Aspekt der Metastasierung genauer zu untersuchen, führten wir Migrationsversuche durch. Dabei stellte sich heraus, dass bei Behandlung mit NVP-AAL881 die Migration der HCC-Zelllinien nicht nur konstitutiv, sondern auch nach Stimulierung durch HGF und EGF, signifikant gehemmt wird. In Anbetracht von neuen Forschungserkenntnis, könnte dieser Effekt also auch teilweise durch die Blockierung des STAT3 verursacht sein. Insgesamt lassen diese Ergebnisse auf eine antimetastatische Wirkung des NVP-AAL881 auch *in vivo* hoffen.

Eine weitere Eigenschaft des STAT3 liegt in der Regulation der Sekretion des VEGF durch Tumorzellen, abhängig und unabhängig vom Transkriptionsfaktor HIF-1 α . Wird STAT3 blockiert, so kommt es zu einer reduzierten Expression von HIF-1 α und VEGF und somit zu

einer Hemmung der Angiogenese {Xu Q, 2005}. Dies versuchten auch wir mithilfe des NVP-AAL881 anhand von HCC-Zellen nachzuweisen. Doch wir konnten unter Behandlung von NVP-AAL881 nur eine Verminderung der Sekretion des VEGF feststellen, die jedoch keine statistische Signifikanz erreichte. Ein Rückgang der Expression des HIF-1 α unter diesen Bedingungen war nicht nachweisbar. Trotzdem zeigte sich in den *in vivo*-Versuchen eine deutlich verminderte Vaskularisierung der mit NVP-AAL881 behandelten Tumoren. Daraus schließen wir, dass die Angiogenese im HCC durch NVP-AAL881 zwar inhibiert wird, jedoch nicht ausgelöst durch einen Effekt an den Tumorzellen, sondern durch eine direkte Wirkung auf Endothelzellen und Perizyten.

6.3. Auswirkung auf die Angiogenese

Da das hepatozelluläre Karzinom ein hypervaskularisierter Tumor ist, der zum weiteren Wachstum auf die Gefäßneubildung angewiesen ist, stellt die Angiogenese einen wichtigen Angriffspunkt in der Tumorthherapie dar. Um neue Gefäße zu bilden, ist eine Aktivierung von Endothelzellen und Perizyten essentiell. Diese Aktivierung erfolgt durch VEGF, welches von Tumorzellen sezerniert wird und an den Endothelzellen angreift (siehe 3.4.1.). Dort fördert es das Wachstum, das Überleben und die Migration der Zellen über Induktion von bestimmten Signaltransduktionswegen wie beispielsweise der Ras-Raf-MEK-ERK-Kaskade {Kroll J, 1997}. Wir wollten nun herausfinden, ob der B-Raf- und VEGF-Rezeptor2-Inhibitor NVP-AAL881 eine direkte Wirkung auf Endothelzellen und Gefäßmuskelzellen ausübt. Dabei stellten wir fest, dass die Behandlung mit NVP-AAL881 zu einer reduzierten Zellproliferation der Endothelzellen führte. Außerdem wurde die durch konditioniertes Medium von HCC-Zellen hervorgerufene Aktivierung des STAT3 in den Endothelzellen verringert. Und zusätzlich trat unter NVP-AAL881-Einfluss eine reduzierte Migration sowohl der Endothelzellen als auch der glatten Gefäßmuskelzellen auf. Schließlich zeigte sich in den *in vivo*-Versuchen eine verminderte Vaskularisierung der Tumoren, die mit NVP-AAL881 behandelt worden waren.

Aus diesen Ergebnissen schließen wir, dass eine kombinierte Inhibition von B-Raf-Kinase und VEGF-Rezeptor2 die Angiogenese des hepatozellulären Karzinoms hemmt, indem sie die Aktivierung, Migration und Proliferation der Endothelzellen und teilweise der Perizyten direkt beeinflusst und nicht durch eine reduzierte Produktion des VEGF von Tumorzellen (siehe auch 6.2.).

6.4. Wertung und Ausblick

In dieser Studie konnten wir nachweisen, dass eine gleichzeitige Inhibition der B-Raf-Kinase und des VEGF-Rezeptor-2 mithilfe des Inhibitors NVP-AAL881 eine effiziente anti-neoplastische Wirkung bei hepatozellulären Karzinomen vermittelt. Wie postuliert, wurden durch den kombinierten Ansatz an der Ras-Raf-MEK-ERK-Kaskade und dem VEGF-Rezeptor-2 sowohl ein antiproliferativer als auch ein antiangiogenetischer Effekt erzielt. Essentielle Prozesse wie Tumorproliferation, Tumorzellmigration und die Vaskularisierung des HCCs wurden gehemmt. Dabei griff der kleinmolekulare Inhibitor NVP-AAL881 sowohl an HCC-Zellen als auch an Endothel- und Gefäßmuskelzellen an.

Außerdem wurde erstmalig gezeigt, dass eine simultane Blockade von B-Raf und VEGF-Rezeptor-2 zu einer verminderten Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors STAT3 in HCC-Zelllinien und Endothelzellen führt, was auch in einer verminderten Vaskularisierung, geringeren Migration und einem gehemmten Tumorwachstum resultiert.

Selbstverständlich ist dies erst der Anfang einer möglichen Therapiealternative zur Behandlung des hepatozellulären Karzinoms. Doch Studien über andere molekulare Inhibitoren zeigen Erfolg versprechende Ergebnisse: Sorafenib (Nexavar, BAY 43-9006), ein weiterer Raf-Kinase-Inhibitor, bewies als erstes molekulares Therapeutikum seine Wirkung gegen das hepatozelluläre Karzinom in einer klinisch randomisierten Phase III-Studie (SHARP-Studie). Hierbei verlängerte eine Behandlung mit Sorafenib das Überleben von Patienten mit fortgeschrittenem HCC {Zhu AX, 2008}.

Es ist jedoch zu bedenken, dass sowohl Sorafenib als auch NVP-AAL881 nur Inhibitoren der B-Raf-Kinase sind und nur geringe Wirkung auf A-Raf und C-Raf ausüben. Ein gleichzeitiger Angriff auf alle drei Mitglieder der Raf-Kinase-Familie könnte unter Umständen die Wirksamkeit einer Raf-Inhibition in der Therapie des hepatozellulären Karzinoms noch weiter verbessern. Dies wäre ein neuer Ansatzpunkt für weitere Studien zur Therapie des HCCs.

Insgesamt stellt aber die kombinierte Blockade der B-Raf-Kinase und des VEGF-Rezeptors2 durch kleinmolekulare Inhibitoren in Zukunft eine viel versprechende Therapiestrategie in der Behandlung des hepatozellulären Karzinoms dar.

7. Literaturverzeichnis

Beeram M, Patnaik A, Rowinsky EK

Raf: a strategic target for therapeutic development against cancer.

J Clin Oncol. 2005; 23(27): 6771-90

Benn J, Schneider RJ

Hepatitis B virus HBx protein activates Ras-GTP complex formation and establishes a Ras, Raf, MAP kinase signaling cascade.

Proc Natl Acad Sci USA 1994; 91(22): 10350-4

Bosch FX, Ribes J, Díaz M, Cléries R

Primary liver cancer: worldwide incidence and trends.

Gastroenterology 2004; 127(5 Suppl 1): S5-S16

Bruix J

Treatment of hepatocellular carcinoma.

Hepatology 1997; 25(2): 259-62

Cha MY, Kim CM, Park YM, Ryu WS

Hepatitis B virus X protein is essential for the activation of Wnt/beta-catenin signaling in hepatoma cells.

Hepatology 2004; 39(6): 1683-93

Choudhari SR, Khan MA, Harris G, Picker D, Jacob GS, Block T, Shailubhai K

Deactivation of Akt and STAT3 signaling promotes apoptosis, inhibits proliferation, and enhances the sensitivity of hepatocellular carcinoma cells to an anticancer agent, Atiprimod.

Mol Cancer Ther. 2007; 6(1): 112-21

Coleman WB

Mechanisms of human hepatocarcinogenesis.

Curr Mol Med. 2003; 3(6): 573-88

Davies H, Bignell GR, Cox C et al.

Mutations of the BRAF gene in human cancer.

Nature 2002; 417(6892): 949-54

El-Serag HB, Mason AC

Rising incidence of hepatocellular carcinoma in the United States.

N Engl J Med. 1999; 340(10): 745-50

Escudier B, Eisen T, Stadler WM, Szczylik C, Oudard S, Siebels M, Negrier S, Chevreau C, Solska E, Desai AA, Rolland F, Demkow T, Hutson TE, Gore M, Freeman S, Schwartz B, Shan M, Simantov R, Bukowski RM; TARGET Study Group

Sorafenib in advanced clear-cell renal-cell carcinoma.

N Engl J Med 2007; 356(2): 125-34

Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J

The biology of VEGF and its receptors.

Nat Med. 2003; 9(6): 669-76

Garnett MJ, Marais R

Guilty as charged: B-RAF is a human oncogene.

Cancer Cell. 2004; 6(4): 313-9

Hicklin DJ, Ellis LM

Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis.

J Clin Oncol. 2005; 23(5): 1011-27

Hilger RA, Scheulen ME, Strumberg D

The Ras-Raf-MEK-ERK pathway in the treatment of cancer.

Onkologie 2002; 25(6): 511-8

Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, Cartwright T, Hainsworth J, Heim W, Berlin J, Baron A, Griffing S, Holmgren E, Ferrara N, Fyfe G, Rogers B, Ross R, Kabbinavar F

Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer.

N Engl J Med 2004; 350(23):2335-42

Kim KJ, Li B, Winer J, Armanini M, Gillett N, Phillips HS, Ferrara N

Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo.

Nature 1993; 362(6423): 841-4

Kroll J, Waltenberger J

The vascular endothelial growth factor receptor KDR activates multiple signal transduction pathways in porcine aortic endothelial cells.

J Biol Chem 1997; 272(51): 32521-7

Lai EC, Lo CM, Fan ST, Liu CL, Wong J

Postoperative adjuvant chemotherapy after curative resection of hepatocellular carcinoma: a randomized controlled trial.

Arch Surg 1998; 133(2): 183-8

Lau CK, Yang ZF, Lam SP, Lam CT, Ngai P, Tam KH, Poon RT, Fan ST

Inhibition of Stat3 activity by YC-1 enhances chemo-sensitivity in hepatocellular carcinoma.

Cancer Biol Ther 2007; 6(12): 1900-7

Lee HC, Tian B, Sedivy JM, Wands JR, Kim M

Loss of Raf kinase inhibitor protein promotes cell proliferation and migration of human hepatoma cells.

Gastroenterology 2006; 131(4):1208-17

Lee YH, Yun Y

HBx protein of hepatitis B virus activates Jak1-STAT signalling.

J Biol Chem 1998; 273(39): 25510-5

Li WC, Ye SL, Sun RX, Liu YK, Tang ZY, Kim Y, Karras JG, Zhang H

Inhibition of growth and metastasis of human hepatocellular carcinoma by antisense oligonucleotide targeting signal transducer and activator of transcription 3.

Clin Cancer Res 2006; 12(23): 7140-8

Liu L, Cao Y, Chen C, Zhang X, McNabola A, Wilkie D, Wilhelm S, Lynch M, Carter C

Sorafenib blocks the RAF/MEK/ERK pathway, inhibits tumor angiogenesis, and induces tumor cell apoptosis in hepatocellular carcinoma model PLC/PRF/5.

Cancer Res 2006; 66(24): 11851-8

Llovet JM, Burroughs A, Bruix J

Hepatocellular carcinoma.

Lancet 2003; 362(9399): 1907-17

Mitsiades CS, Negri J, McMullan C, McMillin DW, Sozopoulos E, Fanourakis G, Voutsinas G, Tseleni-Balafouta S, Poulaki V, Batt D, Mitsiades N

Targeting BRAFV600E in thyroid carcinoma: therapeutic implications.

Mol Cancer Ther 2007; 6(3): 1070-8

Ouyang B, Knauf JA, Smith EP, Zhang L, Ramsey T, Yusuff N, Batt D, Fagin JA

Inhibitors of Raf kinase activity block growth of thyroid cancer cells with RET/PTC or BRAF mutations in vitro and in vivo.

Clin Cancer Res 2006; 12(6): 1785-93

Pang RW, Poon RT

From molecular biology to targeted therapies for hepatocellular carcinoma: the future is now.

Oncology 2007; 72 Suppl 1: 30-44

Park US, Park SK, Lee YI, Park JG, Lee YI

Hepatitis B virus-X protein upregulates the expression of p21waf1/cip1 and prolongs G1→S transition via a p53-independent pathway in human hepatoma cells.

Oncogene 2000; 19(30): 3384-94

Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P

Estimating the world cancer burden: Globocan 2000.

Int. J. Cancer 2001; 94(2): 153-6

Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P

Global Cancer Statistics, 2002

CA Cancer J Clin 2005; 55(2): 74-108

Parkin DM

The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002.

Int J Cancer 2006; 118(12): 3030-44

Roberts PJ, Der CJ

Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer.

Oncogene 2007; 26(22): 3291-310

Roux PP, Blenis J

ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions.

Microbiol Mol Biol Rev 2004; 68(2): 320-44

Roy H, Bhardwaj S, Ylä-Herttuala S

Biology of vascular endothelial growth factors.

FEBS Lett; 2006; 580(12): 2879-87

Sathornsumetee S, Hjelmeland AB, Keir ST, McLendon RE, Batt D, Ramsey T, Yusuff N, Rasheed BK, Kieran MW, Laforme A, Bigner DD, Friedman HS, Rich JN

AAL881, a novel small molecule inhibitor of RAF and vascular endothelial growth factor receptor activities, blocks the growth of malignant glioma.

Cancer Res 2006; 66(17): 8722-30

Schmidt CM, McKillop IH, Cahill PA, Sitzmann JV

Increased MAPK expression and activity in primary human hepatocellular carcinoma.

Biochem Biophys Res Commun 1997; 236(1): 54-8

Semela D, Dufour JF

Angiogenesis and hepatocellular carcinoma.

J Hepatol 2004; 41(5): 864-80

Sridhar SS, Hedley D, Siu LL

Raf kinase as a target for anticancer therapeutics.

Mol Cancer Ther 2005; 4(4): 677-85

Thomas MB, Zhu AX

Hepatocellular carcinoma: the need for progress.

J Clin Oncol 2005; 23(13): 2892-9

Trinchet JC, Ganne-Carrié N, Nahon P, N'kontchou G, Beaugrand M

Hepatocellular carcinoma on patients with hepatitis C virus-related chronic liver disease.

World J Gastroenterol 2007; 13(17): 2455-60

Wiesenauer CA, Yip-Schneider MT, Wang Y, Schmidt CM

Multiple anticancer effects of blocking MEK-ERK signaling in hepatocellular carcinoma.

J Am Coll Surg 2004; 198(3): 410-21

Xu Q, Briggs J, Park S, Niu G, Kortylewski M, Zhang S, Gritsko T, Turkson J, Kay H, Semenza GL, Cheng JQ, Jove R, Yu H

Targeting Stat3 blocks both HIF-1 and VEGF expression induced by multiple oncogenic growth signaling pathways.

Oncogene 2005; 24(36): 5552-60

Yang SF, Wang SN, Wu CF, Yeh YT, Chai CY, Chunag SC, Sheen MC, Lee KT

Altered p-STAT3 (tyr705) expression is associated with histological grading and intratumour microvessel density in hepatocellular carcinoma.

J Clin Pathol 2007; 60(6): 642-8

Zhu AX

Development of sorafenib and other molecularly targeted agents in hepatocellular carcinoma.

Cancer 2008; 112(2): 250-9

8. Lebenslauf

Persönliche Daten:

Geburtsdatum: 14.04.1985

Geburtsort: Stuttgart

Schulausbildung:

1991-2003 Grundschule und Gymnasium in Stuttgart
Gymnasium 8-jähriger Zug mit 4 Leistungskursen
06/2003 Abitur am Karls-Gymnasium Stuttgart

Hochschulausbildung:

2003-2009 Studium der Humanmedizin an der Universität Regensburg
09/2005 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung an der Universität
Regensburg
10-12/2009 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung an der Universität
Regensburg

Publikation:

05/2008 Lang S. A., Brecht I. et al., Dual inhibition of Raf and VEGFR2
reduces growth and vascularization of hepatocellular carcinoma
in an experimental model, Langenbecks archives of surgery
2008; 393 (3), 333-41

Assistenzarztstätigkeit:

Seit 02/2010 Assistenzärztin in der Neurologischen Klinik und Poliklinik des
Universitätsklinikums Würzburg

9. Danksagung

Für die Überlassung des Themas dieser Arbeit, der fachlichen Unterstützung und Förderung danke ich besonders Herrn PD Dr. O. Stöltzing.

Ferner gilt mein Dank für die nette Betreuung und Mithilfe während der gesamten Dissertation Herrn Dr. S. Lang, der stets ein offenes Ohr für alle Fragen und Probleme hatte. Nicht vergessen möchte ich außerdem Frau C. Wagner und Frau K. Stengel, die mir bei den Versuchsdurchführungen zur Seite standen. Zusätzlich danke ich Frau M. Kovacs, die mir nicht nur mit fachlichen Tipps des Öfteren weiterhelfen konnte, sondern mir auch durch ihre Freundschaft immer beistand.

Nicht zuletzt gilt mein Dank meiner Familie und meinen Freunden, die mich bei Erstellung dieser Dissertation unterstützt haben.

10. Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Dual inhibition of Raf and VEGFR2 reduces growth and vascularization of hepatocellular carcinoma in an experimental model

Sven Arke Lang · Isabel Brecht · Christian Moser ·
Aiman Obed · David Batt · Hans Juergen Schlitt ·
Edward Kenneth Geissler · Oliver Stoeltzing

Received: 21 January 2008 / Accepted: 23 January 2008 / Published online: 23 February 2008
© Springer-Verlag 2008

Abstract

Background and aims Activation of the mitogen-activated protein kinase–extracellular-signal-regulated kinase (ERK) pathways plays an important role in the progression of hepatocellular carcinoma (HCC). Importantly, Raf kinases are principal effectors within this oncogenic signaling cascade. We hypothesized that concomitant inhibition of Raf and vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2) will affect tumor growth and angiogenesis of HCC.

Materials and methods Human HCC cell lines, endothelial cells (EC), and vascular smooth muscle cells (VSMC) were used. For blocking Raf kinase and VEGFR2, the small molecule inhibitor NVP-AAL881 (Novartis, USA) was used. Activation of signaling intermediates was assessed by Western blotting, and changes in cell motility were evaluated in migration assays. Effects of NVP-AAL881 on HCC growth were determined in a subcutaneous tumor model.

Results NVP-AAL881 disrupted activation of ERK and

STAT3 in HCC cells and reduced cancer cell motility. In addition, the migration of ECs and VSMC was also significantly impaired. In ECs, HCC-conditioned media-induced activation of STAT3 was diminished by NVP-AAL881 treatment. In vivo, NVP-AAL881 significantly reduced tumor growth, CD31-vessel area, and numbers of BrdU-positive proliferating tumor cells.

Conclusions Combined inhibition of Raf and VEGFR2 disrupts oncogenic signaling and efficiently reduces tumor growth and vascularization of HCC. Hence, this strategy could prove valuable for therapy of HCC.

Keywords Raf · HCC · STAT3 · Angiogenesis · Tumor growth

Introduction

Hepatocellular carcinoma (HCC) is, worldwide, the fifth leading cause for cancer-related death annually [1]. To date, surgical resection or liver transplantation are the only curative treatment options available, with 5-year survival rates ranging from 15% to 39% upon resection and up to 61% for liver transplantation [2, 3]. However, at the time of diagnosis, most patients present in an advanced tumor stage when potentially curative therapies are less effective. In addition, due to organ shortage, patients on the waiting list for liver transplantation frequently demonstrate a progressive disease. Therefore, new therapies, such as molecular-targeted approaches, are needed to improve outcome of patients with this aggressive disease.

Interestingly, the Raf serine–threonine kinases, consisting of three members (A-Raf, B-Raf, C-Raf), have recently emerged as promising molecular targets for cancer therapy [reviewed in [4]]. In particular, the B-Raf mediated

German Society of Surgery, Surgical Forum 2008, Best of Abstracts

Sven Arke Lang and Isabel Brecht contributed equally to this work.

These studies were supported, in part, by the German Cancer Aid (Deutsche Krebshilfe, Max-Eder Programm, Bonn, Germany; O.S.), and a grant from the University of Regensburg, Medical Faculty (ReForM; O.S.; S.A.L.).

S. A. Lang (✉) · I. Brecht · C. Moser · A. Obed · H. J. Schlitt ·
E. K. Geissler · O. Stoeltzing
Departments of Surgery and Surgical Oncology,
University of Regensburg Medical Center,
Franz-Josef-Strauss-Allee 11,
93042 Regensburg, Germany
e-mail: sven.lang@klinik.uni-regensburg.de

D. Batt
Novartis Institutes for Biomedical Research, Novartis,
Cambridge, MA, USA

activation of mitogen-activated protein kinase (MAPK)–extracellular-signal-regulated kinase (ERK) signaling pathway is implicated in the progression and invasive growth of various tumor entities [5, 6]. In HCC, strong expression of MAPK has been demonstrated to occur predominantly in tumor tissue, as compared to adjacent non-neoplastic areas in the liver [7], and the activation of down-stream ERK is associated with a poor prognosis of HCC patients [8]. Importantly, HCC has been described to be a highly angiogenic and vascularized tumor and therapies targeting angiogenesis hold promise for effective treatment of this tumor entity [9]. Recent studies indicated that, in addition to activation of VEGF receptor-2 (VEGFR2), the phosphorylation of transcription factor signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) is correlated with an increased intra-tumoral microvessel density (MVD). Moreover, STAT3 may also serve as a predictive factor for a poor survival of HCC patients [10]. Notably, endothelial cells (EC) and pericytes (vascular smooth muscle cells (VSMC)) are essential cellular components for initiating tumor angiogenesis, and their regulation involves, in part, the activation of VEGFR2 or VEGF-A-induced signaling (reviewed in [11]). Particularly the migration and proliferation of ECs, two important steps in angiogenesis, are mediated via VEGFR2-induced activation of MEK/ERK [12]. Taken together, therapy strategies targeting both Ras/Raf/MEK/ERK signaling in tumor cells and VEGFR signaling in ECs may represent an attractive approach for the molecular treatment of HCC.

NVP-AAL881 is an orally available small molecule inhibitor of Raf and VEGFR2 that has been shown to block proliferation and orthotopic tumor growth in a preclinical model of glioma [13]. Furthermore, in thyroid cancer, significant antitumor activity was described when tumor cells harbor mutations in the *B-Raf* gene (V600E) [14, 15]. For the present study, we hypothesized that dual targeting of Raf kinase and VEGFR2 could inhibit oncogenic signaling in HCC tumor cells, and decrease angiogenesis through effects on ECs and VSMCs. Our results show that therapy with NVP-AAL881 effectively down-regulates the activation of STAT3 in vitro and diminishes tumor growth and vascularization of HCC in vivo.

Material and methods

Cell lines and reagents

Human HCC cell lines (HepG2, Huh-7) were purchased from the American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA), and EC and VSMC were obtained from Promocell (Heidelberg, Germany). HepG2 and Huh-7 cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM;

Gibco, Karlsruhe, Germany) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) and maintained in 5% CO₂ at 37°C. Human recombinant hepatocyte growth factor (HGF) and epidermal growth factor (EGF) were purchased from R&D (R&D Systems, Wiesbaden, Germany). The small molecule inhibitor NVP-AAL881 was kindly provided by Novartis Oncology (Cambridge, MA, USA), and dissolved in DMSO for in vitro experiments. For in vivo use, NVP-AAL881 was dissolved in 100% ethanol to a concentration of 100 mg/ml and further diluted with 5% D-(+)-glucose or cremaphor EL (Sigma Aldrich, Germany) to 10 mg/ml [15].

MTT assay

To evaluate the effects of NVP-AAL881 on the proliferation of tumor cells, cells (1×10^3 /well) were seeded into 96-well plates and exposed to various concentrations of NVP-AAL881 (24 and 48 h). We used the methylthiazole tetrazolium (MTT) assay to assess cell viability, as previously described [16]. Experiments using ECs and VSMCs were performed accordingly.

Cell motility assays

Migration assays were performed using modified Boyden chambers, as described elsewhere [17]. Briefly, 5×10^4 cells were resuspended in 1% FCS-DMEM and seeded into inserts with 8 µm filter pores (BD Bioscience, Heidelberg, Germany) \pm HGF (50 ng/ml), or \pm EGF (40 ng/ml). After 24 h, or 48 h, cells were fixed and stained (Diff-Quick reagent, Dade Behring, Newark, NJ, USA). Cells, which had migrated through the filters, were counted in four random fields, and average numbers were calculated. For migration of ECs and VSMCs, conditioned media from HepG2 and Huh-7 HCC cells was used as a chemo-attractant. Conditioned media (CM) for migration experiments was prepared from tumor cells, as described [16].

Signaling experiments

Cells were used at 60–70% cell density. Tumor cells were incubated with NVP-AAL881 at indicated concentrations and subsequently stimulated with various growth factors. ECs and VSMCs were incubated with NVP-AAL881 (2 µM) and subsequently stimulated with conditioned media from Huh-7 cells. Whole cell lysates were prepared as previously described [16]. Protein samples (50 µg) were subjected to Western blotting on a denaturing 10% SDS-PAGE. Membranes were sequentially probed with antibodies to indicated signaling intermediates. Antibodies were purchased from Cell Signaling Technologies (Beverly, MA, USA) for phospho-ERK^{Thr202/Tyr204}, ERK, phospho-MEK^{Ser217/221}, MEK, phospho-STAT^{Tyr705}, STAT3, Santa

Cruz Biotechnologies (Santa Cruz, CA, USA) for β -actin. Membranes were probed with an antibody and chemiluminescence detection was performed thereafter (ECL, Amersham Bioscience, NJ, USA).

Subcutaneous tumor model

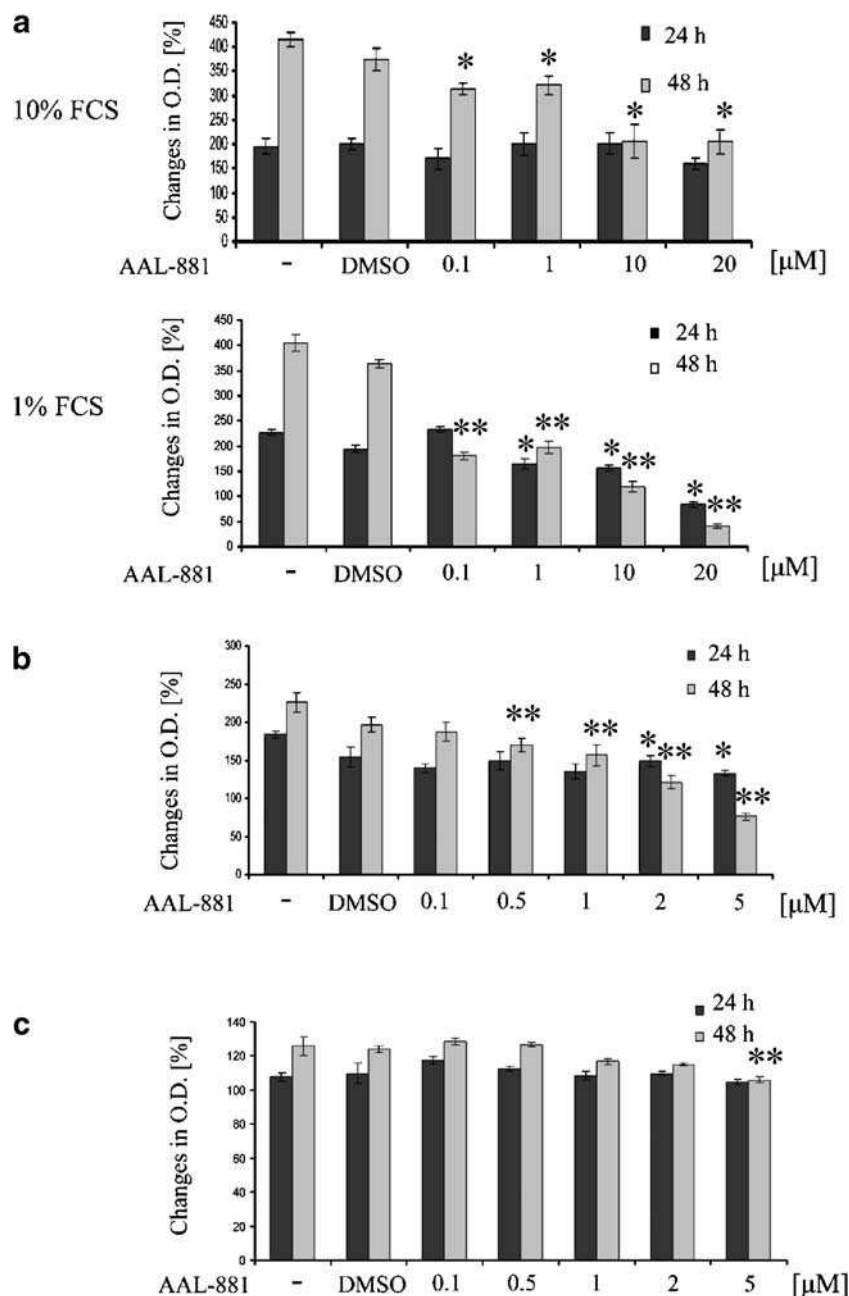
All procedures were performed with approval of the Institutional Animal Care and Use Committee as well as the University Ethical Committee. Huh-7 cells (1×10^6) were injected into the subcutis of nude mice (Charles River, Sulzfeld, Germany). Mice were randomized ($n=9$ – 10 /group) and assigned to either therapy or control group.

Treatment started on day 4 after tumor cell inoculation with NVP-AAL881 100 mg/kg daily, or vehicle by oral gavage. Tumor diameters were measured every other day and tumor volumes were calculated using the equation: $\text{width}^2 \times \text{length} \times 0.5$. The experiment was terminated on day 8, at which time subcutaneous tumors were excised, weighed, and prepared for immunohistochemical analysis.

Immunohistochemical analyses of vessel area (CD31) and tumor cell proliferation (BrdU)

CD-31 positive vessel area was assessed using rat anti-mouse CD31/PECAM-1 antibody (Pharmingen, San Diego,

Fig. 1 Effect of NVP-AAL881 on cell growth in vitro. MTT assays were performed with tumor cells, ECs and VSMCs. **a** Tumor cells were incubated with increasing concentrations of NVP-AAL881. After 48 h significant inhibition of in vitro growth was observed when cells were cultured in medium containing 10%FCS ($*p<0.05$, first row). In serum-reduced medium, significant growth-inhibitory effects seen after 24 h ($*p<0.05$ for 24 h; $**p<0.05$ for 48 h; second row). Similar results were found in HepG2. **b** In ECs, a similar dose-dependent inhibition of in vitro growth was observed ($*p<0.05$ for 24 h; $**p<0.05$ for 48 h). **c** In VSMC, growth inhibition upon treatment with NVP-AAL881 was only found at high concentrations after 48 h ($*p<0.05$). Bars = SEM



CA, USA) and peroxidase-conjugated goat anti-rat IgG (Jackson Research Laboratories, West Grove, PA, USA), as previously described [18]. Antibody binding was visualized using stable diaminobenzidine. Images were obtained in four different quadrants of each tumor section at $\times 40$ magnification. Measurement of vessel area of CD31-stained vessels was performed by using ImageJ software (version 1.33; National Institute of Health, Bethesda, MD, USA). Vessel areas were expressed as pixels per high-power field. For assessment of proliferating tumor cells, mice received intraperitoneal injections of Bromodesoxyuridine (BrdU, Sigma Aldrich, Germany; 1.0 mg/mouse) 2 h prior to termination of animal studies. A commercially available BrdU detection kit (Becton Dickinson Bioscience, Heidelberg, Germany) was used to visualize BrdU uptake of proliferating cells in sections of tumors from sacrificed mice, according to the manufacturer's protocol. BrdU-positive tumor cells were counted in four fields per tumor section and averages were calculated [18, 19].

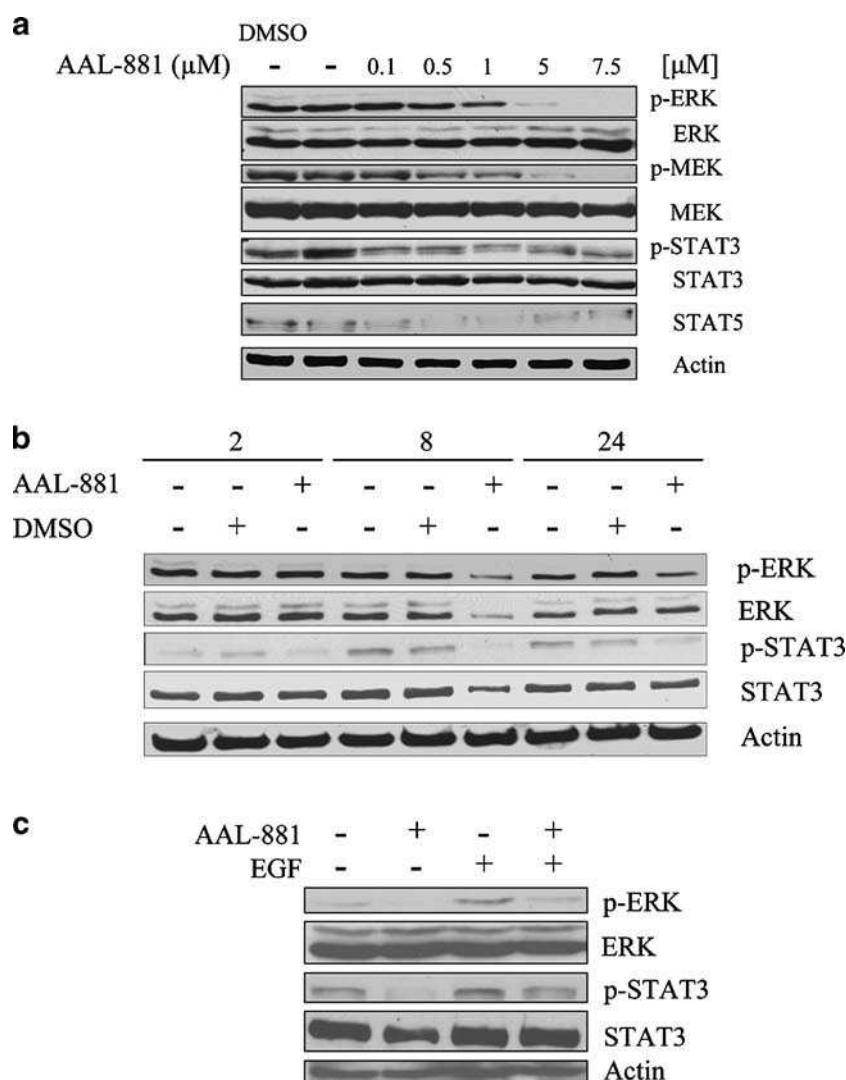
Statistical analyses

Statistical analyses were performed using SigmaStat (Version 3.0). Results of in vivo experiments were analyzed for significant outliers using the Grubb's test for detecting outliers (www.graphpad.com). Tumor-associated variables in in vivo experiments were tested for statistical significance using the Mann-Whitney *U* test for non-parametric data. The two-sided student's *t*-test was applied for analysis of in vitro data. All results are expressed as the mean \pm SEM.

Results

To assess the effects of a concomitant Raf/VEGFR2 blockade on HCC tumor cells in vitro, Huh-7 and HepG2 cells were incubated with various concentrations of NVP-AAL881. As determined by MTT assays, NVP-AAL881 led to a dose-dependent inhibition of growth rates of HCC

Fig. 2 Western Blot analyses of signaling intermediates in HCC cell lines. **a** Tumor cells were incubated with increasing concentration of NVP-AAL881 for 20 h. A dose-dependent inhibition of phosphorylation of ERK, MEK and STAT3 was observed. In addition expression of STAT5 was downregulated. **b** Tumor cells were incubated with NVP-AAL881 (2 μ M) for different time-points. Phosphorylation of ERK was inhibited after 8 h. In contrast, activation of STAT3 was diminished already after 2 h. **c** Cells were pre-incubated for 20 h with NVP-AAL881 (2 μ M) and subsequently stimulated with EGF. Blocking Raf led to a reduction in constitutive and EGF-induced activation of ERK and STAT3. All results shown for Huh-7 cells (confirmed in HepG2)



cells after 48 h (Fig. 1a, first row). This growth-inhibitory effect was further enhanced when tumor cells were incubated in reduced-serum conditions (Fig. 1a, second row).

Next, we sought to investigate the effect of NVP-AAL881 on the activation of signaling pathways *in vitro*. Incubation of HCC cell lines with increasing concentrations of NVP-AAL881 (20 h) resulted in a dose-dependent inhibition of phosphorylation of ERK, MEK, and STAT3 (Fig. 2a). Using a time course with NVP-AAL881 (2 μ M) in HCC cells, we found that blocking Raf led to a decrease in constitutive STAT3 phosphorylation (Fig. 2b). In addition, changes in ERK phosphorylation were also apparent after 8 h of treatment. Because EGF is a known activator of oncogenic signaling in HCC, we next investigated the effect of NVP-AAL881 (2 μ M) on EGF-dependent activation of ERK and STAT3 signaling intermediates. By Western Blot analysis, we determined that Raf inhibition resulted in a disruption of EGF-induced phosphorylation of both ERK and STAT3 down-stream effectors (Fig. 2c).

Importantly, Raf signaling is also implicated in constitutive and growth factor-induced cell motility. Thus, we subsequently evaluated the effects of NVP-AAL881 (2 μ M) on the migratory properties of HCC tumor cells. In Boyden chamber assays, inhibition of Raf/VEGFR2 reduced basal tumor cell migration of both Huh-7 and HepG2 cells ($p < 0.05$). Furthermore, we found that HGF and EGF both induced tumor cell migration *in vitro* ($p < 0.05$). Treatment with NVP-AAL881 significantly reduced cell motility induced by these growth factors ($p < 0.05$ for both; Fig. 3a,b).

It is widely accepted that endothelial cells and vascular smooth muscle cells play a pivotal role in tumor angiogenesis [20]. We, therefore, elucidated the impact of NVP-AAL881 on ECs and VSMCs in MTT assays and detected a dose-dependent inhibition of EC proliferation (Fig. 1b). In contrast, NVP-AAL881 elicited only minor effects on the growth of VSMCs (Fig. 1c). Furthermore, in order to mimic a milieu similar to HCC tumors, CM from Huh-7 cells was used for consecutive migration and signaling experiments. In Boyden chamber assays, dual inhibition of Raf and VEGFR2 substantially reduced the migration of both ECs (Fig. 4a), and VSMCs (data not shown). We conclude from these experiments that signaling inhibition by NVP-AAL881 could be effective for impairing the angiogenic process *in vivo*. Hence, we next addressed this aspect of signaling inhibition by NVP-AAL881 using conditioned media for stimulating ECs. In a time course experiment, we detected that CM led to an activation of STAT3 in ECs. Interestingly, pre-incubation of ECs with NVP-AAL881 substantially reduced the phosphorylation of STAT3 (Fig. 4b).

To further validate these *in vitro* findings of combined inhibition of Raf and VEGFR2 in terms of reducing growth of HCC, we subsequently performed a subcutane-

ous tumor model. Treatment of mice with NVP-AAL881 (100 mg/kg/day) significantly reduced growth of xenograft tumors, compared to controls (Fig. 5a). This potent growth-inhibitory effect was also reflected by final tumor weights ($p < 0.05$; Fig. 5a). In addition, we detected a significant reduction of CD31 vessel area in tumors treated with NVP-AAL881 ($p < 0.05$; Fig. 5c). Moreover, in accordance with our *in vitro* results and with reduced tumor weight *in vivo*, numbers of proliferating tumor cells were markedly reduced in treated tumors, as compared to controls ($p < 0.05$; Fig. 5d).

Discussion

In the present study, we demonstrate that dual inhibition of Raf and VEGFR2 is an effective way for reducing tumor growth and vascularization of hepatocellular cancer. Importantly, inhibition of Raf/VEGFR2 disrupts pro-angiogenic signaling cascades in both tumor cells and endothelial cells and diminishes pro-migratory properties of cells.

Targeting Raf kinases is a novel concept for molecular-targeted therapy of cancer because the Raf kinase family is

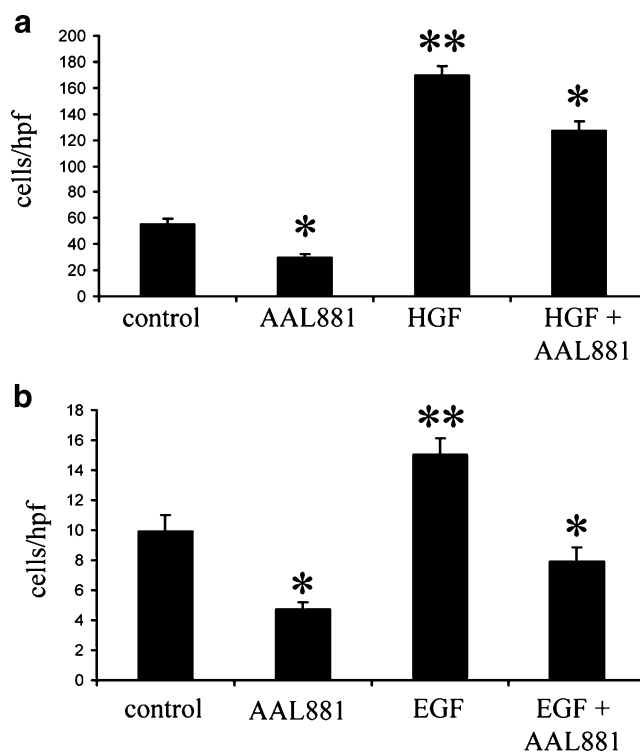
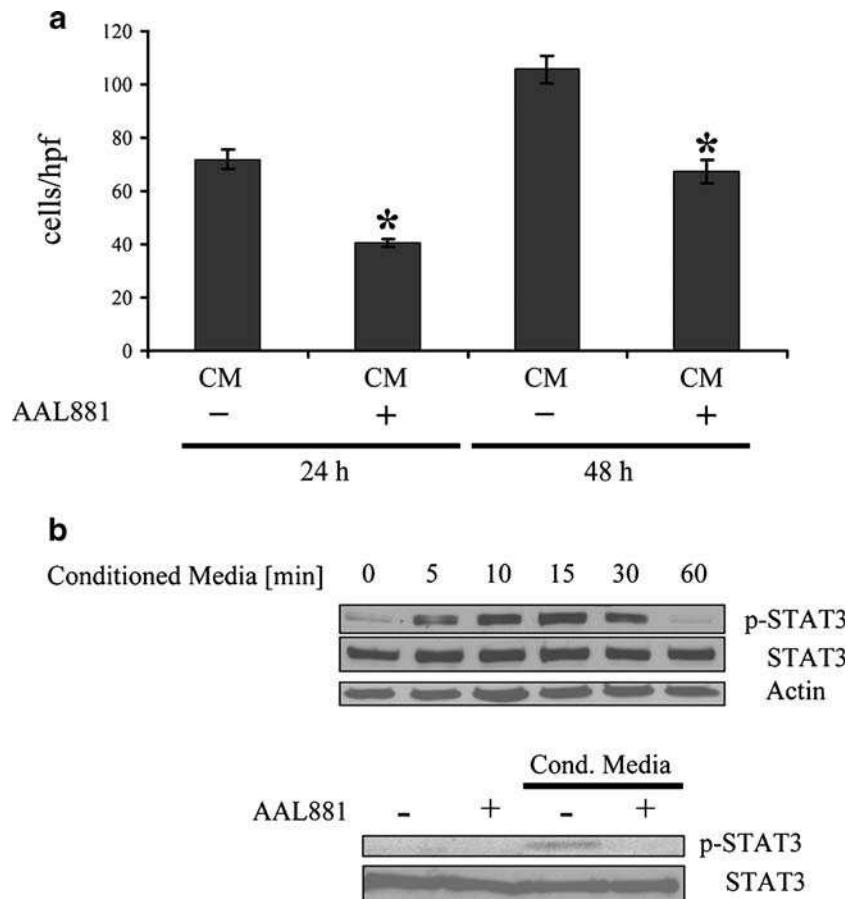


Fig. 3 Boyden chamber assay for assessing tumor cell migration. **a** HGF significantly increased tumor cell migration *in vitro* (** $p < 0.05$). NVP-AAL881 led to an inhibition of basal and HGF-induced cell motility of Huh-7 cells (* $p < 0.05$ for both). **b** Similarly, incubation with EGF promoted tumor cell motility (** $p < 0.05$). This effect was impaired upon treatment with NVP-AAL881 (* $p < 0.05$). Similar significant results were obtained with HepG2 cells. Bars = SEM

Fig. 4 Cell motility and signaling pathway activation in ECs. **a** Treatment of EC with NVP-AAL881 (2 μ M) significantly reduced migration of ECs in conditioned media (CM) from Huh-7 cells after 24 and 48 h ($*p<0.05$). Bars = SEM **b** Stimulation of EC with CM led to a phosphorylation of STAT3. Upon pretreatment with the B-Raf/VEGFR2 inhibitor NVP-AAL881 (2 μ M), activation of STAT3 was substantially diminished

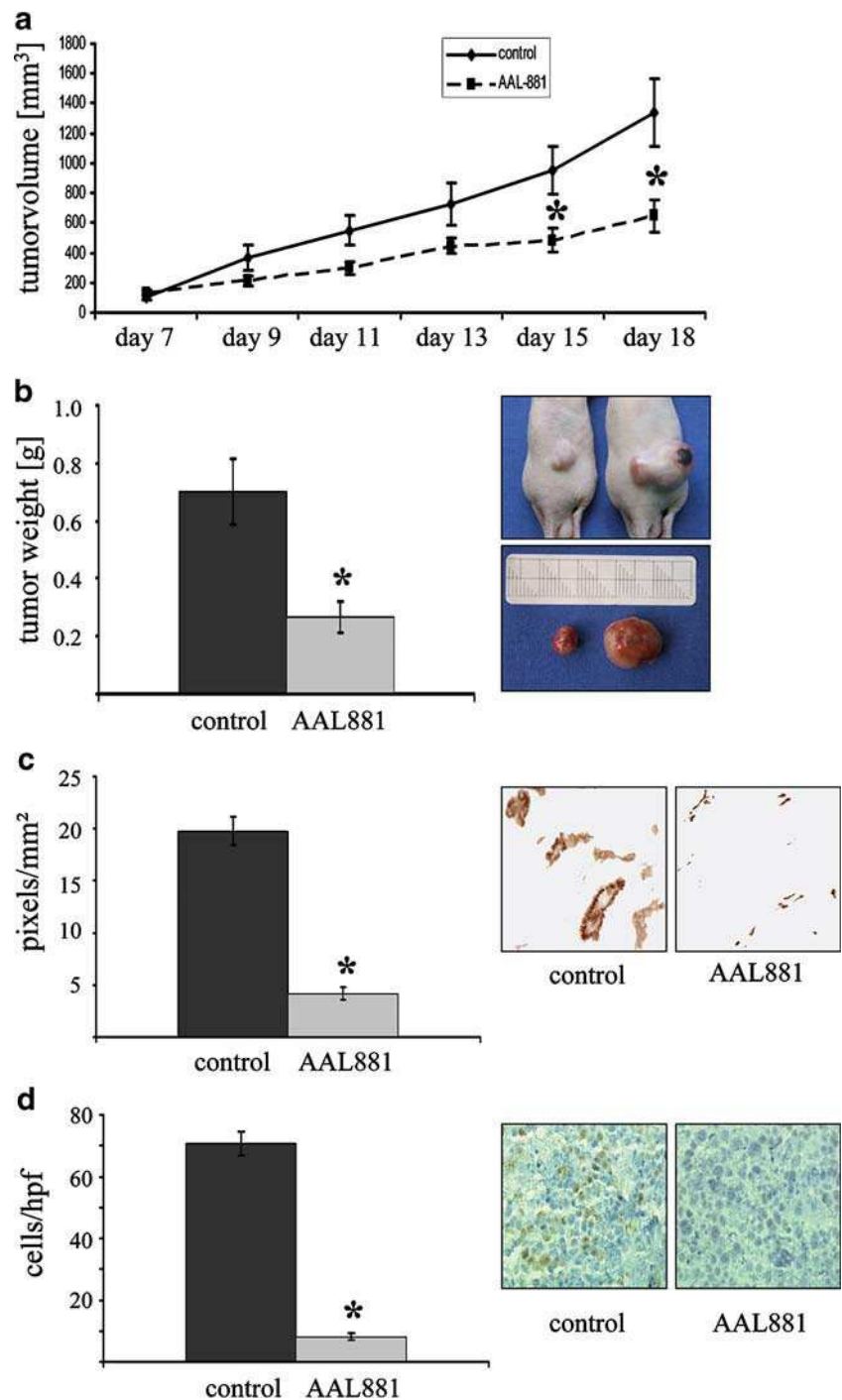


implicated in the Ras–Raf–MEK–ERK oncogenic signaling pathway. Their involvement in tumor cell proliferation and tumor progression is well demonstrated. In our study, we assessed the potential of a novel Raf/VEGFR2 inhibitor, NVP-AAL881, for reducing growth and vascularization of HCC [13]. To date, NVP-AAL881 has shown antitumor activity in some preclinical models of glioma and thyroid cancer, in particular when these tumors were harboring B-Raf mutations [13–15]. Within these studies, NVP-AAL881 was able to impair ERK signaling, as well as the activation of MEK in investigated cancer cell lines. The results from our study now suggest that NVP-AAL881 is indeed effective in inhibiting Raf kinase in HCC and in blocking constitutive and EGF-induced activation of MEK–ERK signaling. As we observed a significant inhibition of cell proliferation *in vivo*, our findings are in concordance with results from other studies showing that inhibition of MEK reduces cell proliferation of HCC cells *in vitro* [21]. Taken together, our study provides evidence that Raf inhibition with NVP-AAL881 reduces HCC cell proliferation, at least in part, by targeting the MEK–ERK signaling cascade.

Furthermore, we found that inhibition of Raf/VEGFR2 reduces constitutive and EGF-induced activation of the transcription factor STAT3. This is of particular interest

because activation (phosphorylation) of STAT3 (Tyr705) is closely related to histological grading, intra-tumoral vessel density, and a predictor of poor survival in patients suffering from HCC [10]. Moreover, preclinical data suggests that inhibition of STAT3 improves sensitivity to chemotherapy and inhibits proliferation of human HCC cell lines [22, 23]. Regarding tumor metastasis, we demonstrated a reduction of constitutive, EGF- and HGF-induced cell migration upon treatment with NVP-AAL881 in both cell lines, suggesting that this therapy concept could elicit anti-metastatic properties *in vivo*. Again, this effect appears, in part, to be mediated by targeting STAT3, based on studies by Li and coworkers describing a reduction of tumor growth and metastasis upon STAT3 inhibition [24]. In addition, STAT3 can regulate secretion of VEGF from tumor cells in a HIF-1 α -dependent and HIF-1 α -independent manner [19, 25]. However, we did not detect a decrease in hypoxia-induced expression of HIF-1 α upon treatment with NVP-AAL881, but constitutive secretion of VEGF from tumor cells was diminished, although this did not reach statistical significance (data not shown). Nevertheless, vascularization of treated tumors was significantly reduced in *in vivo* studies and we, therefore, suppose that inhibition of angiogenesis is rather mediated by effects on endothelial

Fig. 5 Subcutaneous tumor model for evaluating the effect of NVP-AAL881 on tumor growth in vivo. **a** Treatment with Raf/VEGFR2 inhibitor (100 mg/kg/day) significantly reduced growth of Huh-7 cells in vivo ($*p<0.05$). **b** This growth inhibition was also reflected by final tumor weights ($*p<0.05$). **c** Immunohistological analyses of CD31 vessel area. NVP-AAL881 markedly reduced vascularization of HCC tumors ($*p<0.05$). **d** Assessment of tumor cell proliferation in vivo showed significantly less BrdU-positive cells in NVP-AAL881 treated tumors, compared to controls ($*p<0.05$)



cells and pericytes than on tumor cells. This is in support of a novel rationale for targeting both Raf and VEGFR2 for therapy of HCC.

Regarding endothelial cells and the use of a VEGFR2 inhibitor for cancer therapy, it is important to realize that induction of two major pathways, PI3K–Akt and Raf–MEK–ERK, are necessary for the proliferation, migration and survival of ECs [11]. Activation of ECs, as well as pericytes, is critical for angiogenesis [20, 26]. We,

therefore, tested the effect of conditioned media from human HCC cell lines on signaling in ECs. Inhibition of Raf/VEGFR2 led to a reduced cell proliferation and impaired conditioned media-induced activation of STAT3. In addition, migration assays revealed a reduction in EC and pericyte motility upon treatment with NVP-AAL881. From these results, we concluded that combined inhibition of Raf and VEGFR2 reduces vascularization of HCC xenografts by affecting motility, proliferation, and activa-

tion of EC and, in part, pericytes rather than reducing production of proangiogenic VEGF from HCC tumor cells.

In fact, another Raf kinase inhibitor, Sorafenib (Nexavar, BAY 43–9006), has currently proven its efficacy against hepatocellular cancer in randomized phase III trial (SHARP trial). Within this study, Sorafenib prolonged overall survival of patients with advanced HCC [27]. These are encouraging results because to date, HCC has been almost refractory to systemic treatment. However, Sorafenib and NVP-AAL881 are both inhibitors of B-Raf, and both substances exert only minor activity against A-Raf and C-Raf. One can speculate that targeting all three members of Raf kinase family might further improve efficacy of Raf inhibition in therapy of HCC.

In conclusion, we demonstrated for the first time that targeting Raf/VEGFR2 leads to reduced phosphorylation of the transcription factor STAT3 in HCC cell lines and endothelial cells. This translates into potent inhibition of tumor growth, vascularization, and tumor cell motility. Therefore, our results provide basis for the rationale of using Raf/VEGFR2 kinase inhibitors for molecular therapy for patients with HCC.

Acknowledgements The authors thank Christine Wagner and Kathrin Stengel for excellent technical assistance.

References

- Llovet JM, Burroughs A, Bruix J (2003) Hepatocellular carcinoma. *Lancet* 362:1907–1917
- Takenaka K, Kawahara N, Yamamoto K, Kajiyama K, Maeda T, Itasaka H, Shirabe K, Nishizaki T, Yanaga K, Sugimachi K (1996) Results of 280 liver resections for hepatocellular carcinoma. *Arch Surg* 131:71–76
- Yoo HY, Patt CH, Geschwind JF, Thuluvath PJ (2003) The outcome of liver transplantation in patients with hepatocellular carcinoma in the United States between 1988 and 2001: 5-year survival has improved significantly with time. *J Clin Oncol* 21:4329–4335
- Beeram M, Patnaik A, Rowinsky EK (2005) Raf: a strategic target for therapeutic development against cancer. *J Clin Oncol* 23:6771–6790
- Garnett MJ, Marais R (2004) Guilty as charged: B-RAF is a human oncogene. *Cancer Cell* 6:313–319
- Tuveson DA, Weber BL, Herlyn M (2003) BRAF as a potential therapeutic target in melanoma and other malignancies. *Cancer Cell* 4:95–98
- Schmidt CM, McKillop IH, Cahill PA, Sitzmann JV (1997) Increased MAPK expression and activity in primary human hepatocellular carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun* 236:54–58
- Schmitz KJ, Wohlschlaeger J, Lang H, Sotiropoulos GC, Malago M, Steveling K, Reis H, Cicinnati VR, Schmid KW, Baba HA (2008) Activation of the ERK and AKT signalling pathway predicts poor prognosis in hepatocellular carcinoma and ERK activation in cancer tissue is associated with hepatitis C virus infection. *J Hepatol* 48:83–90
- Semela D, Dufour JF (2004) Angiogenesis and hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 41:864–880
- Yang SF, Wang SN, Wu CF, Yeh YT, Chai CY, Chunag SC, Sheen MC, Lee KT (2007) Altered p-STAT3 (tyr705) expression is associated with histological grading and intratumour microvessel density in hepatocellular carcinoma. *J Clin Pathol* 60:642–648
- Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J (2003) The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 9:669–676
- Roux PP, Blenis J (2004) ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol Mol Biol Rev* 68:320–344
- Sathornsumetee S, Hjelmeland AB, Keir ST, McLendon RE, Batt D, Ramsey T, Yusuff N, Rasheed BK, Kieran MW, Laforme A, Bigner DD, Friedman HS, Rich JN (2006) AAL881, a novel small molecule inhibitor of RAF and vascular endothelial growth factor receptor activities, blocks the growth of malignant glioma. *Cancer Res* 66:8722–8730
- Mitsiades CS, Negri J, McMullan C, McMillin DW, Sozopoulos E, Fanourakis G, Voutsinas G, Tseleni-Balafouta S, Poulaki V, Batt D, Mitsiades N (2007) Targeting BRAFV600E in thyroid carcinoma: therapeutic implications. *Mol Cancer Ther* 6:1070–1078
- Ouyang B, Knauf JA, Smith EP, Zhang L, Ramsey T, Yusuff N, Batt D, Fagin JA (2006) Inhibitors of Raf kinase activity block growth of thyroid cancer cells with RET/PTC or BRAF mutations in vitro and in vivo. *Clin Cancer Res* 12:1785–1793
- Stoeltzing O, Ahmad SA, Liu W, McCarty MF, Wey JS, Parikh AA, Fan F, Reinmuth N, Kawaguchi M, Bucana CD, Ellis LM (2003) Angiopoietin-1 inhibits vascular permeability, angiogenesis, and growth of hepatic colon cancer tumors. *Cancer Res* 63:3370–3377
- Bauer TW, Liu W, Fan F, Camp ER, Yang A, Somcio RJ, Bucana CD, Callahan J, Parry GC, Evans DB, Boyd DD, Mazar AP, Ellis LM (2005) Targeting of urokinase plasminogen activator receptor in human pancreatic carcinoma cells inhibits c-Met- and insulin-like growth factor-I receptor-mediated migration and invasion and orthotopic tumor growth in mice. *Cancer Res* 65:7775–7781
- Stoeltzing O, McCarty MF, Wey JS, Fan F, Liu W, Belcheva A, Bucana CD, Semenza GL, Ellis LM (2004) Role of hypoxia-inducible factor 1alpha in gastric cancer cell growth, angiogenesis, and vessel maturation. *J Natl Cancer Inst* 96:946–956
- Lang SA, Moser C, Gaumann A, Klein D, Glockzin G, Popp FC, Dahlke MH, Piso P, Schlitt HJ, Geissler EK, Stoeltzing O (2007) Targeting heat shock protein 90 in pancreatic cancer impairs insulin-like growth factor-I receptor signaling, disrupts an interleukin-6/signal-transducer and activator of transcription 3/hypoxia-inducible factor-1alpha autocrine loop, and reduces orthotopic tumor growth. *Clin Cancer Res* 13:6459–6468
- Dvorak HF (2003) Rous-Whipple Award Lecture. How tumors make bad blood vessels and stroma. *Am J Pathol* 162:1747–1757
- Wiesbauer CA, Yip-Schneider MT, Wang Y, Schmidt CM (2004) Multiple anticancer effects of blocking MEK-ERK signaling in hepatocellular carcinoma. *J Am Coll Surg* 198:410–421
- Choudhary SR, Khan MA, Harris G, Picker D, Jacob GS, Block T, Shailubhai K (2007) Deactivation of Akt and STAT3 signaling promotes apoptosis, inhibits proliferation, and enhances the sensitivity of hepatocellular carcinoma cells to an anticancer agent, Atiprimod. *Mol Cancer Ther* 6:112–121
- Lau CK, Yang ZF, Lam SP, Lam CT, Ngai P, Tam KH, Poon RT, Fan ST (2007) Inhibition of Stat3 Activity by YC-1 Enhances Chemo-Sensitivity in Hepatocellular Carcinoma. *Cancer Biol Ther* (in press)
- Li WC, Ye SL, Sun RX, Liu YK, Tang ZY, Kim Y, Karras JG, Zhang H (2006) Inhibition of growth and metastasis of human hepatocellular carcinoma by antisense oligonucleotide targeting signal transducer and activator of transcription 3. *Clin Cancer Res* 12:7140–7148
- Xu Q, Briggs J, Park S, Niu G, Kortylewski M, Zhang S, Gritsko T, Turkson J, Kay H, Semenza GL, Cheng JQ, Jove R, Yu H

- (2005) Targeting Stat3 blocks both HIF-1 and VEGF expression induced by multiple oncogenic growth signaling pathways. *Oncogene* 24:5552–5560
26. Kroll J, Waltenberger J (1997) The vascular endothelial growth factor receptor KDR activates multiple signal transduction pathways in porcine aortic endothelial cells. *J Biol Chem* 272:32521–32527
27. Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V, Hilgard P, Raoul J, Zeuzem S, Poulin-Costello M, Moscovici M, Voliotis D, Bruix J (2007) Sorafenib improves survival in advanced Hepatocellular Carcinoma (HCC): Results of a Phase III randomized placebo-controlled trial (SHARP trial). 2007 ASCO Annual Meeting, Regensburg, Germany, 10 May 2007